

6. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., Богатырева А.О. Выделение и характеристика штаммов – продуцентов бактериальной целлюлозы // Микробиология. 2020. Том 89, № 1. С. 88–98.
7. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Покидько Б.В., Пименов Н.В., Марданов А.В., Равин Н.В. Характеристика нового штамма *Xanthomonas campestris* M 28 – продуцента ксантана, исследование генома, условий культивирования и физико-химических и реологических свойств полисахарида // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57, № 3. С. 251–261.
8. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Braz. J. Microbiol. 2018. Vol. 49. P. 151–159.
9. Revin V.V., Liyaskina E.V., Bogatyreva A.O., Nazarova N.B., Upyrkina E.S., Kurgaeva I.V., Vasilov R.G. Bacterial cellulose based nanocomposites // Nanobiotechnology Reports. 2023. Vol. 18. № 1. P. 56–63.
10. Revin V.V., Parchaykina M.V., Upyrkina K.S., Liyaskina E.V., Kurgaeva I.V., Grunuyshkin I.P., Novozhilova O.S., Tairova M.R., Devyatkin A.A. Effect of Biocomposites on Bacterial Cellulose-Based Hydrogel and Physiologically Active Compounds on Regeneration Processes in the Skin's Lipid Phase After Burn Injury // Opera Medica et Physiologica. 2022. № 4. P. 72–91.
11. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.
12. Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., Nazarova N.B., Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride // Polymers. 2021. Vol.13. P. 1422.
13. Revin V.V., Pestov N.A., Shchankin M.V., Mishkin V.P., Platonov V.I., Uglanov D.A. Study of the Physical and Mechanical Properties of Aerogels Obtained from Bacterial Cellulose // Biomacromolecules. 2019. Vol. 20 (3). P. 1401–1411.

УДК 632.93

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-1-59-62>

НЕЙРОТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ОСЫ-НАЕЗДНИКА *HABROBRACON HEBETOR* И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СОЗДАНИИ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

А.Г. Шухалова, С.А. Тимофеев, И.В. Сендерский, В.В. Долгих,

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Эктопаразитоид личинок чешуекрылых насекомых – оса наездник *Habrobracon hebetor* может быть использована как средство биологической борьбы с вредителями, особенно с южной амбарной огнёвкой *Plodia interpunctella* – опасным вредителем хранилищ зерна и других сухих продуктов. Самки *H. hebetor* находят гусениц чешуекрылых и вводит в их гемолимфу яд, содержащий набор нейропаралитических токсинов, что приводит к парализации жертв. После этого паразитоид откладывает на парализованное насекомое яйца, из которых выходят личинки, питающиеся гемолимфой хозяина вплоть до окукливания, а парализованная гусеница погибает [6]. Однако использование этих насекомых в борьбе с вредителями ограничено. Взрослые особи *H. Hebetor* впадают в диапаузу, индуцированную фотопериодом, и не устойчивы к холодной температуре [3]. Поэтому было предложено использовать в биологической защите растений яды ос наездников и их компоненты без участия самих насекомых.

Еще в конце прошлого века из яда *H. hebetor* были выделены 2 нейротоксина, с молекулярной массой 30 кДа (Т30) и 16 кДа (Т16), которые обладали высокой способностью парализовать личинки чешуекрылых. Токсины из яда осы выделяли из целых ос или рассеченных ядовитых желез. Эти структуры гомогенизировали и обрабатывали ультразвуком для растворения биологически активных токсинов. Затем гомогенат центрифугировали из супернатанта выделяли токсины с различной молекулярной массой с помощью аффинной хроматографии с красителем и лигандом, в том числе так были выделены токсины. Небольшое количество высокоочищенной фракции токсина вводилось путем инъекции в брюшную полость личинок табачной совки, что приводило к парализации насекомых. Аминокислотные последовательности и кДНК токсина впоследствии были определены с помощью масс спектрометрии и запатентованы [4, 5]. Однако недавно истек срок действия авторских прав на эти патенты, поэтому данные про токсины Т16 и Т30 стали доступны для свободного использования.

Так как данные нейротоксины поражают нервную ткань и функционируют в гемолимфе жертвы, то оральный способ доставки биопестицидов на их основе невозможен. Для доставки таких токсинов к вредителям могут использоваться различные биологические агенты, например вирусы. Вирусные биопестициды обладают специфичной вирулентностью по отношению к целевым насекомым, при этом они безопасны для теплокровных животных, рыб, птиц и других полезных организмов. Они быстро разлагаются в природе, что делает их более экологически безопасными по сравнению с химическими пестицидами. Наиболее известные и часто используемые вирусы – это бакуловирусы (*Baculoviridae*) из семейства палочковидных. Они заражают преимущественно чешуекрылых и безвредны для

человека [1]. Главным недостатком вирусных препаратов является то, что дикий штамм может иметь относительно не высокую малую вирулентность и вызывать смерть насекомых вредителей лишь через длительный отрезок времени после заражения. Одним из способов решения этой проблемы является генетическая модификация вируса.

За последние три десятилетия были разработаны различные методики по генетической модификации бакуловируса [2].

1. Классический метод

Традиционный подход заключается в котрансфекции клеток насекомых бакуловирусным геномом и специальной плазмидой переносчиком, которая несёт интересующие гены. Однако низкая частота рекомбинации в диапазоне от 0,1 % до 1 % приводит к колоссальному содержанию нерекомбинантного вируса дикого типа. Это усложняет процесс выделения и очистки, поскольку требует выполнения множества этапов отбора клонов, что занимает много времени.

2. Линеаризация вируса

Для снижения репродуктивной способности материнского вируса было выполнено линеаризование бакуловирусного генома в специфическом сайте рестрикции (Bsu36I), расположенном в гене *polh*, ответственном за синтез основного белка полиэдрина. Данный ген также содержит сильный промотор бакуловируса для эффективной экспрессии в клетках насекомых. Поскольку линейный геном не способен самостоятельно реплицироваться (неинфекционный), то образуются только те геномы, которые при рекомбинации с вектором-переносчиком образуют кольцевую структуру. В результате данной модификации система может обеспечить частоту рекомбинации в пределах 30 %, но вероятность выделения вируса дикого типа все еще присутствует.

3. Система Bac-to-Bac

Еще один наиболее широко используемый метод сайт-специфической транспозиции в бакмиду, содержащую бакуловирусный геном. Эта технология доступна под названием Bac-to-Bac (Invitrogen). Процесс создания рекомбинантных бакуловирусов заключается в транспозиции интересующую нуклеотидную последовательность в вектор переносчик, который в будущем клонируется в штамм бактерий *Escherichia coli* DH10Bac. Этот штамм *E. coli* содержит вспомогательную плазмиду-бакмиду, которая кодирует образование вирусных частиц. При трансформации происходит сайт-специфическая рекомбинация и образуется рекомбинантный бакуловирусный геном. Отбор осуществляется при помощи метода бело-голубой селекции. Полученной бакмидой трансфицируют клеточную культуру, в которой реплицируется и нарабатывается рекомбинантный бакуловирус.

4. Система Flasf BAC

На основе системы Bac-to-Bac компанией Oxford Expression Technologies был разработан другой метод под названием Flasf BAC. Он также включает в себя использование бакмиды, однако в ней частично удалены некоторые гены. Сама гомологичная рекомбинация с вектором переносчиком проходит не в бактериях, а в клетках насекомых. Метод Flash BAC увеличивает выход целевых белков. А в сочетании с системой MultiBac (Geneva Biotech) можно экспрессировать множество пептидов. Эта система позволяет вставлять чужеродные гены в два разных локуса сконструированного генома бакуловируса.

В нашем исследовании мы привели пример использования бакуловирусов для защиты растений, его генетической модификации и экспрессии нейротоксинов осы-наездника *Habrobracon hebetor*. На основе опубликованной информации о 2 токсинах с молекулярной массой 30 кДа (T30) и 16 кДа (T16) их аминокислотная последовательность была модифицирована, были добавлены сайты рестрикции, а также последовательность, кодирующая сигнальный пептид, отвечающий за секрецию данного белка. Если встроить последовательность нейротоксинов в геном вирусов так, чтобы заражаемые ими клетки насекомых продуцировали активный токсин и секретировали его в гемолимфу – также будет происходить парализация вредителей, что может значительно увеличить негативный эффект на их популяцию, по сравнению с заражением не модифицированным бакуловирусом.

В рамках этой работы мы провели первый этап тестирования нейротоксинов, используя модельную систему бакуловирусной экспрессии Bac-to-Bac в культуре клеток насекомых. Клетки насекомых способны распознавать и обрабатывать сигнальные пептиды, поддерживать олигомеризацию и осуществлять посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и образование дисульфидной связи, что позволяет правильное формирование аутентичных эукариотических белков, в отличие от прокариотических систем экспрессии. Так как в

этом случае клеточная культура заражается рекомбинантным бакуловирусом, несущим изучаемый ген так же, как это происходит и при заражении клеток вредителей, то появляется возможность определить, будет ли данная молекула продуцироваться клетками насекомых в активной растворимой форме и далее секретироваться во внешнюю среду. Это необходимо для ее воздействия на нервную систему вредителя.

Для достижения результата модифицированная последовательность T30 и T16 была синтезирована *de novo* в компании Евроген (Россия) в составе плазмиды для бакуловирусной экспрессии rFastBac™ Dual. Для синтеза белка в бактериях и получения к нему антител последовательность T30 выделяли из исходного вектора рестрикцией и клонировали с использованием штамма *E. coli* XL-BLUE MRF в составе плазмиды rRSET A. Данный вектор предназначен для высокоэффективной экспрессии белков в бактериях под контролем промотера Pt7 бактериофага T7. Индукция экспрессии в данной системе происходит изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Экспрессию производили в бактериях *E. coli* штамм C41 (производный из BL21(DE3)). Первоначально экспрессию проводили по стандартному протоколу, в вентилируемых конических колбах (аэробные условия), 15 часов при 37 °С, с добавлением индуктора экспрессии до 1 мМ (конечная концентрация). После культивации клетки бактерий разрушали ультразвуком, центрифугированием отделяли растворимую и не растворимую белковые фракции, подвергали их электрофорезу в полиакриламидном геле и анализировали на наличие синтезированного белка с помощью иммуноблотинга с применением антител к полигистидиновой последовательности, которая пришивается к любому продукту, синтезированному с помощью вектора rRSET A. Эксперимент показал накопление искомой молекулы T16 токсина в клетках бактерий в не растворимой форме, однако уровень экспрессии T30 был относительно не высоким и значительную часть белковой фракции составляли примеси других бактериальных белков. Для оптимизации экспрессии были опробованы другие условия культивации бактерий, и наилучшего результата для нейротоксина T30 удалось добиться при экспрессии в не вентилируемых конических пробирках (анаэробные условия) при комнатной температуре. Так как не значительный уровень бактериальных примесей не является препятствием для иммунизации животных, полученный препарат был использован для этого без дополнительной очистки. Не растворимую белковую фракцию после экспрессии тщательно отмывали, денатурацию и растворение проводили с помощью 1 % раствора додецилсульфата натрия (SDS). Избыток SDS удаляли из пробы с помощью диализа и измеряли концентрацию белка спектрофотометрическим методом Бредфорда. Мышей иммунизировали 4 раза внутривенными инъекциями по 100 мкг белка с интервалом 10 дней, отбирая кровь спустя 10 дней после последней иммунизации. Для последующих экспериментов использовали иммунную сыворотку крови, содержащую полученные антитела.

Для получения рекомбинантного бакуловируса была проведена химическая трансформация клеток DH10Bac и вектора rFastBac™ Dual. Нуклеотидная последовательность этого штамма называется бакмидой, так как включает в себя не только элементы бактериальной плазмиды ДНК, но и геном вируса ядерного полиэдроса *Autographa californica* (AcNPV). Встраивание фрагмента донорной плазмиды в сайт интеграции бакмиды нарушает рамку считывания гена *lacZ*. В результате бактерии, несущие рекомбинантные (со вставкой) бакмиды, образуют белые колонии в присутствии IPTG и X-Gal. В наличии вставки клонированного гена после всех этих этапов можно убедиться при помощи ПЦР. Рекомбинантную бакмиду, содержащую ген токсинов нарабатывали в больших количествах и выделяли из клеток бактерий. Трансфекцию клеточной культуры Sf9 проводили с помощью реагента Cellfectin. В результате происходило встраивание генома рекомбинантного вируса с геном T16 или T30 из бакмиды в геном зараженных клеток, в которых за счет этого происходила экспрессия вирусных генов, включая встроенный токсин, и образовывались вирусные частицы.

Зараженную клеточную культуру выращивали в течение недели, используя наработанные вирусные частицы для заражения новых клеток. Было проведено 4 пассажа, что позволило получить большое количество вирусных частиц. После последнего пассажа экспрессия T16 и T30 проходила в клетках Sf9 в течение 2 или 4 дней после финального заражения с последующим анализом накопления токсина как в клетках, так и в культуральной среде с использованием полученных ранее антител. Для этого клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием, разрушали ультразвуком, вновь разделяли центрифугированием не растворимые белки в осадке от растворимых в супернатанте. Иммуноблотинг

продемонстрировал, что уже на 2 сутки экспрессии большая часть Т30 обнаруживалась в нерастворимой части гомогената клеток насекомых, белок обнаруживался также в растворимой (активной) форме и секретировался клетками в культуральную среду, а на 4 сутки количество белка в культуральной среде значительно возрастало. Однако токсин Т16 на 2 сутки не был обнаружен, а на 4 день находился только в нерастворимом осадке.

Таким образом, мы продемонстрировали, что нейротоксин Т30 будет более перспективным по сравнению с Т16. При заражении клеток насекомых рекомбинантным вирусом с геном Т30, данный токсин может эффективно синтезироваться в активной форме и секретироваться во внешнюю среду. При заражении непосредственно вредителей, а не клеточных культур, это приведет к попаданию нейротоксина в гемолимфу насекомого, где белок сможет воздействовать на его нервную систему, что делает данную молекулу перспективной для создания биопестицидов на основе рекомбинантных бакуловирусов.

На данный момент проводятся биотесты по заражению гусениц Пчелиной огневки (*Galleria mellonella*) для определения эффективности рекомбинантных бакуловирусов, как инсектицида. Заражение осуществляется с помощью инъекций шприцем Гамильтона. В качестве контроля используется вирус, секретирующий светящийся белок GFP. Оценка экспрессии в клетках насекомого будет осуществляться такими методами, как электрофорез и ПЦР в реальном времени.

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант 23–26–00039.

Литература

1. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Бакуловирусная система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков: «Universum: химия и биология», 2019. С. 13.
2. Fabre ML, Arrias PN, Masson T, Pidre ML, Romanowski V. Baculovirus-Derived Vectors for Immunization and Therapeutic Applications. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. 2020:197–224. doi: 10.1016/B978-0-12-814966-9.00011-1.
3. Huang Y., Liu W., Lü J., Wang W., Guo Y. Temperature Effect on the Growth and Development of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Ephesia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Insects*. 2024 May 7; 15(5):336. doi: 10.3390/insects15050336. PMID: 38786892; PMCID: PMC11122503.
4. Johnson J.H., Kral R.M., Krapcho K. Insecticidal toxins from bracon hebetor. Patent WO1996025429 WIPO (PCT). 1996.
5. Johnson J.H., Kral R.M., Krapcho K. Insecticidal toxins from Bracon hebetor nucleic acid encoding said toxin and methods of use. Patent US5874298 United States. 1999.
6. Mbata G.N., Warsi S. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as Tools in Post-Harvest Integrated Pest Management. *Insects*. 2019 Mar 27; 10(4):85. doi: 10.3390/insects10040085.