

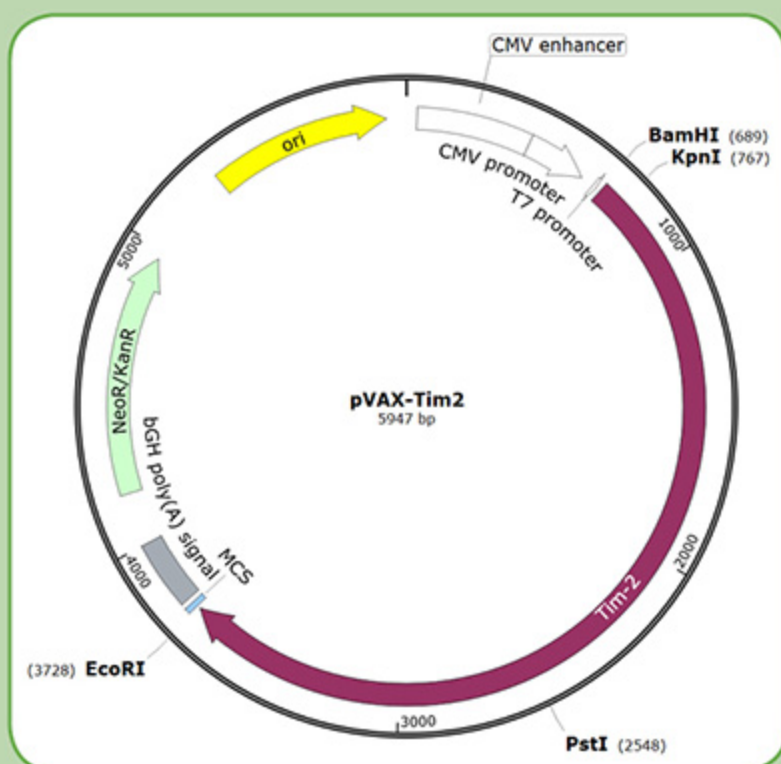


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2024 TOM VOLUME 107 ВЫПУСК ISSUE 3



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

ПОДБОР ФРАГМЕНТА δ -ЛАТРОИНСЕКТОТОКСИНА ИЗ ЯДА КАРАКУРТА *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

С.А. Тимофеев^{1*}, А.Г. Шухалова¹, О.А. Павлова^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: ts-bio@ya.ru

Токсины из ядов хищных и паразитоидных членистоногих, например скорпионов, пауков или ос наездников, используют в качестве перспективного инструмента в различных областях защиты растений от насекомых вредителей. Для исследования подобных молекул в лабораторных условиях во многих случаях может быть полезным создание к ним поликлональных антител, что позволит использовать специфичные методы их детекции и очистки. В представленном исследовании осуществлена гетерологичная экспрессия δ -латроинсектотоксина из яда каракурта *Latrodectus tredecimguttatus*, а также его N- и C-концевых фрагментов в клетках *Escherichia coli* при различных температурах и условиях аэрации. Независимо от условий экспрессии накопление рекомбинантного белка в клетках бактерий в виде телец включений наблюдалось только для C-концевого фрагмента токсина. Высокая эффективность экспрессии этого фрагмента позволила использовать нерастворимую белковую фракцию гомогената бактерий для иммунизации мышей и создания антител к δ -латроинсектотоксину. Антигенсвязывающая активность иммуноглобулинов была подтверждена с помощью иммуноблоттинга изучаемого фрагмента токсина, синтезированного в бактериях с помощью вектора с удаленными лидерными последовательностями. Полученные антитела могут быть использованы для детекции токсина каракурта при его экспрессии в различных системах, например при создании генетически модифицированных энтомопатогенных грибов или вирусов.

Ключевые слова: биологическая защита растений, гетерологичная экспрессия, поликлональные антитела

Поступила в редакцию: 13.08.2024

Принята к печати: 15.10.2024

Введение

Биологическая борьба с вредителями в сельском хозяйстве представляет собой безопасную и экологически чистую альтернативу широко распространенному использованию синтетических пестицидов (Kumar and Singh, 2015). Разнообразные естественные враги насекомых, включая членистоногих хищников или паразитоидов, а также патогенные организмы, такие как бактерии, вирусы и грибы, как по отдельности, так и в комбинациях, могут быть использованы для этой цели (Koller et al., 2023). Тем не менее, этот подход лишен недостатков, включая относительно низкие темпы искоренения вредителей, уязвимость патогенов к влиянию окружающей среды и т. д. (Moscardi, 1999). В определенной степени эту проблему можно решить с помощью генетической модификации патогенов насекомых, направленной на повышение их вирулентности и устойчивости (Kroemer et al., 2015; Lovett and St. Leger, 2018).

Пауки рода *Latrodectus* (черные вдовы) считаются одними из наиболее «ядовитых» паукообразных. Их яд имеет крайне широкий спектр действия и смертельно опасен как для насекомых и других членистоногих, так и для млекопитающих (Yan et al., 2015; Wang et al., 2019). На сегодняшний день из ядов этих пауков выделены и характеризованы десятки белковых токсинов, часто оказывающих специфичное действие на определенную группу животных (Wang et al., 2007; Yan et al., 2015; Wang et al., 2019).

Важное отличие ядов черных вдов от ядов других членистоногих состоит в преобладании в них уникальных высокомолекулярных белков (более 100 кДа) над лишь небольшим числом пептидов (Wang et al., 2007; He et al., 2013). Одна из групп таких молекул – латроинсектотоксины (latroinsectotoxins), оказывающие воздействие исключительно на насекомых, но не опасные для млекопитающих. Например, для α -латроинсектотоксина показана способность образовывать поры в липидных мембранах насекомых в области нервно-мышечных синапсов, что приводит к массовым неспецифическим выбросам нейромедиаторов (Wang et al., 2019). Несмотря на то, что данный токсин способен образовывать подобные поры и в искусственно созданных липидных мембранах, токсичное воздействие на нервно-мышечную систему наблюдается только при инъекции белка насекомым. Предполагается, что подобная специфичность определяется взаимодействием токсина с определенными рецепторами клеток насекомых, облегчающими прикрепление токсина к мембране (Rohou and Ushkaryov, 2007).

Объектом этого исследования является δ -латроинсектотоксин (δ ЛИТ), выделенный из яда паука *L. tredecimguttatus* и характеризованный еще в конце прошлого века. Тогда была определена кодирующая данный белок последовательность кДНК длиной 3642 пар нуклеотидов (Дулубова и др. 1996). Впоследствии авторы продемонстрировали,

что полноразмерная форма белка не является активной, и в его состав также входит С-концевой домен, удаляемый при процессинге молекулы (Dulubova et al., 1996). В этом исследовании авторам также удалось экспрессировать активную форму белка в бактериях и продемонстрировать его высокую токсичность для насекомых (ЛД₅₀ = 10–50 мкг на кг веса тела личинок комнатной мухи). В последующих исследованиях была определена третичная структура данного белка (Chen et al., 2021), а также показано, что этот токсин экспрессируется исключительно у самок каракуртов и только в их ядовитых железах, тогда как многие другие токсины этой группы выделяют и из других органов пауков (Togres et al., 2022).

Специфичное действие латроинсектотоксинов на насекомых и их безопасность для человека делает эти молекулы перспективными для использования в защите растений как в качестве непосредственно потенциальных пестицидов, так и для создания на их основе генетически модифицированных организмов, используемых в качестве биопестицидов. Последовательности, кодирующие токсины из ядов членистоногих, широко применяются для создания рекомбинантных энтомопатогенных грибов или бакуловирусов с повышенной вирулентностью (Kroemer et al., 2015; Lovett et al., 2018), однако латроинсектотоксины еще не были исследованы в этом контексте. Важным этапом создания и изучения таких рекомбинантных патогенов

является получение антител к белкам, чьи кодирующие последовательности встраиваются в их геномы. Специфичные антитела позволяют детектировать изучаемую молекулу на любом этапе экспрессии и демонстрировать, действительно ли изучаемый продукт секретируется патогеном в организм насекомого-вредителя.

Несмотря на то, что активная форма дЛИТ уже была успешно синтезирована в бактериях ранее, авторы отмечали крайне низкую эффективность экспрессии. Рекомбинантный белок составлял лишь доли процента от общего состава гомогената бактерий (Dulubova et al., 1996). Для препаративной наработки рекомбинантного белка и получения антител необходимо значительно увеличить выход продукта. При этом, для иммунизации не обязательно синтезировать белок целиком, может быть достаточно и фрагмента молекулы (Bobkova et al., 2014).

В задачи представленной работы входили оптимизация условий бактериальной экспрессии и получение поликлональных антител к δ-латроинсектотоксину *L. tredecimguttatus*, необходимых для дальнейшего изучения молекулы при ее встраивании в геномы других организмов. В связи с этим в рамках данной работы, помимо подбора различных условий экспрессии дЛИТ в бактериях, была осуществлена наработка С- и N-концевых фрагментов молекулы размером 593 и 394 аминокислотных остатка, соответственно.

Материалы и методы

Молекулярное клонирование

Последовательность мРНК, кодирующая δ-латроинсектотоксин *L. tredecimguttatus*, находится в открытом доступе на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/puccore/X92679>). Участок последовательности, кодирующий активную форму токсина размером 991 аминокислотных остатка (Dulubova et al., 1996), синтезирован *de novo* в составе плазмиды pVAX в компании Евроген (Россия) с добавлением N-концевого сигнального пептида (СП) белка Mc11 энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABB20937.1>). Кодоны для синтеза были подобраны таким образом, чтобы в составе последовательности присутствовали сайты распознавания ферментами рестрикции: *Bam*HI в начале последовательности, *Kpn*I на участке между СП и дЛИТ, *Pst*I в срединной части дЛИТ и *Eco*RI в конце (рис. 1). Для гетерологичной экспрессии участок дЛИТ без СП переклонировали с сохранением рамки считывания по ранее описанной методике (Timofeev et al., 2024) в вектор pRSET C (Thermo Fisher Scientific, США) по сайтам рестрикции *Kpn*I и *Eco*RI; N-коцевой фрагмент по сайтам рестрикции *Kpn*I и *Pst*I в тот же вектор. С-концевой фрагмент переклонировали в вектор pRSET B и в модифицированный pRSET B, с удаленным С-терминальным тагом и лидерными последовательностями, полученный ранее (Dolgikh et al., 2020) по сайтам *Pst*I и *Eco*RI. Корректность встраивания последовательностей в плазмиды проверяли секвенированием (Евроген, Россия).

Гетерологичная экспрессия δ-латроинсектотоксина в *Escherichia coli*

Для гетерологичной экспрессии фрагментов дЛИТ в бактериях использовали штамм *E. coli* C41, полученный

на основе штамма BL21(DE3). Трансформацию бактерий конструкциями на основе векторов pRSET проводили с помощью электропоратора Electroporator 2510 (Eppendorf, Germany). Колонии бактерий из агаризированных чашек со средой Luria Broth (LB), содержащей 0.15 мг/мл ампициллина, инокулировали в герметично закрытые конические пробирки емкостью 50 мл (анаэробные условия) или в вентилируемые колбы емкостью 100 мл (аэробные условия) с 20 мл той же жидкой среды. Культуры выращивали до оптической плотности 600 = 0.6, затем индуцировали экспрессию добавлением 0.1 мМ изопропил β-d-1-тиога-лактопиранозид (ИПТГ) (конечная концентрация) с последующей инкубацией при комнатной температуре или при 37°C в течение 15 ч. После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут и обрабатывали ультразвуком в 50 мМ ТБС (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 150 мМ NaCl) с использованием ультразвукового гомогенизатора Qsonica q700 (Qsonica, СТ). После 10-минутного центрифугирования при 15000 g образцы белка для электрофореза в полиакриламидном геле готовили из супернатанта, а также нерастворимого осадка, содержащего тельца включения белка (IBS), ресуспендированные в равном супернатанту объеме ТБС. Электрофорез белковых проб и иммуноблотинг с использованием антител к полигистидиновой последовательности (Merck, Германия) проводили, как это было описано ранее (Dolgikh et al., 2020; Timofeev et al., 2024).

Получение и проверка поликлональных антител к δ-латроинсектотоксину

Для иммунизации мышей (беспородные мыши из питомника лабораторных животных «Рапполово»), содержащихся в виварии лаборатории микробиологической защиты растений ФБГНУ ВИЗР, использовали тела

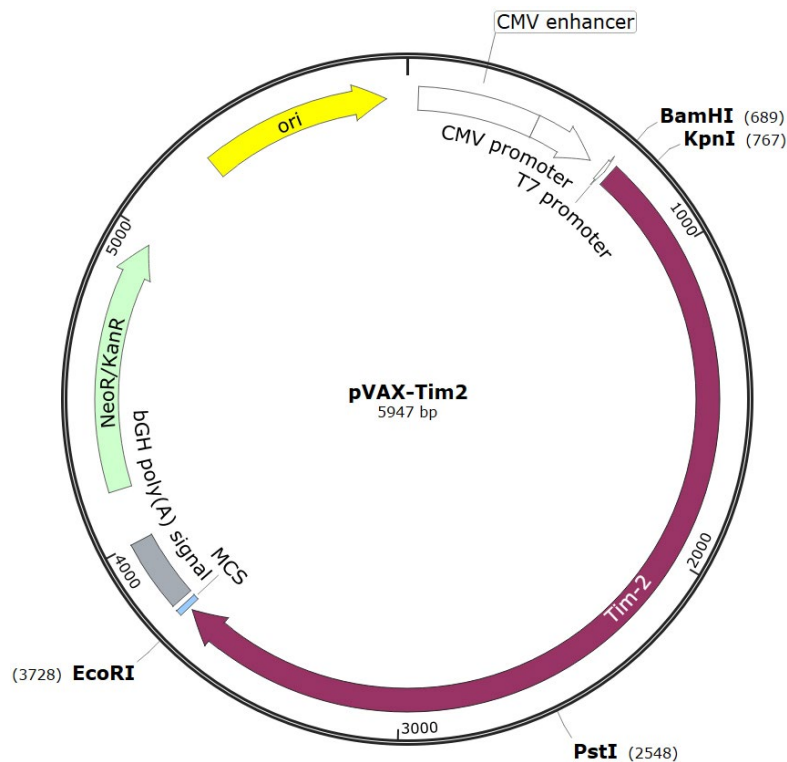


Рисунок 1. Схема конструкции на основе вектора pVAX1, в который была синтезирована кДНК активной формы δ -латроинсектотоксина *L. tredecimguttatus* с сигнальным пептидом белка Mcl1 *M. anisopliae*. δ -латроинсектотоксин обозначен как Tim-2, отмечены сайты рестрикции, по которым происходило переклонирование токсина и его фрагментов в другие плазмиды для гетерологичной экспрессии

Figure 1. Diagram of the construct based on the pVAX1 vector. The cDNA of the active form of δ -latroinsectotoxin from *L. tredecimguttatus* with signal peptide of the *M. anisopliae* Mcl1 protein was synthesized into the vector. δ -latroinsectotoxin is designated as Tim-2, with restriction sites marked indicating where the toxin and its fragments were subcloned into other plasmids for heterologous expression

включения С-концевого фрагмента δ ЛИТ, осажденные после обработки ультразвуком образцов, культивированных в вентилируемых колбах при 37°C. Тельца включения промывали 50 мМ ТБС 3 раза и растворяли в 50 мМ ТБС с 1% додецилсульфатом натрия (SDS). Избыточный SDS удаляли диализом против в 50 мМ ТБС с помощью набора для диализа Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000 (Merck, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрации белка в образце определяли коллометрически с помощью метода Брэдфорда с использованием спектрофотометра pr80 (Implen, Германия). Сохранность белка в пробах после диализа также проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Мышей иммунизировали 4 внутрибрюшными инъекциями по 100 мкг белка с интервалом 10 дней, отбирая кровь спустя 10 дней после последней иммунизации. Для этого животных усыпляли парами хлороформа и проводили декапитацию. Кровь настаивали в

течение суток при температуре 37°C, удаляя основную часть клеточных элементов вместе с образовавшимся тромбом. Оставшиеся клеточные элементы крови осаждали центрифугированием при 3000g в течение 20–30 минут. Полученную сыворотку разводили глицерином 1:1 и хранили при -20°C. Для проверки сыворотки на наличие в ней антител к δ ЛИТ ее использовали в разведении 1:2000 для иммуноблотинга С-концевого фрагмента токсина, экспрессированного с помощью модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом и лидерными последовательностями. В качестве контроля использовали аналогичную пробу гомогената бактерий, полученную после трансформации вектором pRSET B с геном *vpr1* *Pimpla hypochondriaca* (Dani et al., 2010). В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные конъюгаты с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты

Последовательность, кодирующая активную часть δ ЛИТ *L. tredecimguttatus*, слитую с СП белка Mcl1 *M. anisopliae*, была синтезирована *de novo* в составе вектора pVAX1. Последовательность, соответствующая активной форме токсина без СП, а также С- и N-концевые фрагменты молекулы размером 593 и 394 аминокислотных остатка, соответственно, были переклонированы в вектор pRSET B. Этот вектор обеспечивает экспрессию в

клетках *E. coli* под контролем промотора T7 и индукцию изопропил β -d-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ). Клетки бактерий после 15 часовой экспрессии в аэробных или анаэробных условиях, при 37°C или при комнатной температуре полноразмерного токсина, а также его С- и N-концевых фрагментов, гомогенизировали ультразвуком, отделяли фракции растворимых и нерастворимых белков, которые впоследствии подвергали электрофорезу

в полиакриламидном геле и окрашивали Кумасси бриллиантовым синим. Эксперимент выявил накопление мажорного белка только в пробах с экспрессией С-концевого фрагмента δ ЛИТ (рис. 2). Независимо от условий экспрессии, белок молекулярной массой около 46–48 кДа, что соответствовало предполагаемому размеру фрагмента в 43 кДа с добавленным 4 кДа С-терминальным тагом, входящим в состав вектора pRSET B, накапливался в клетках в виде нерастворимых телец включений в количестве, значительно превышающем другие бактериальные белки. Иммуноблоттинг с антителами против полигистидиновой последовательности, входящей в С-терминальный участок вектора, подтвердил соответствие наблюдаемой полосы рекомбинантному белку (рис. 2 f). На основании этого С-терминальный фрагмент был использован в качестве антигена для получения поликлональных антител к δ ЛИТ.

Тела включения с δ ЛИТ после экспрессии в аэробных условиях при 37°C дополнительно отмывали от остатков

растворимых белков бактерий и растворяли в слабом растворе детергента, удаляя затем его излишки с помощью диализа. Подготовленный таким образом препарат использовали для иммунизации мышей. Сохранность белка после диализа проверяли с помощью электрофореза (рис. 2 e). Для проверки сыворотки, полученной после завершения цикла иммунизаций, на наличие в ней антител к δ ЛИТ мы экспрессировали фрагмент δ ЛИТ с использованием модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом, содержащим так называемые лидерные последовательности: Полигистидиновый участок, T7 gene 10 leader, Xpresssm EpiCore. При экспрессии изучаемого фрагмента δ ЛИТ с помощью модифицированного вектора в таких же условиях, как и при подготовке антигена для иммунизации, окрашивание суммарных белков Кумасси продемонстрировало наиболее выраженное накопление белка размером около 37 кДа в нерастворимой бактериальной фракции при ожидаемом размере продукта

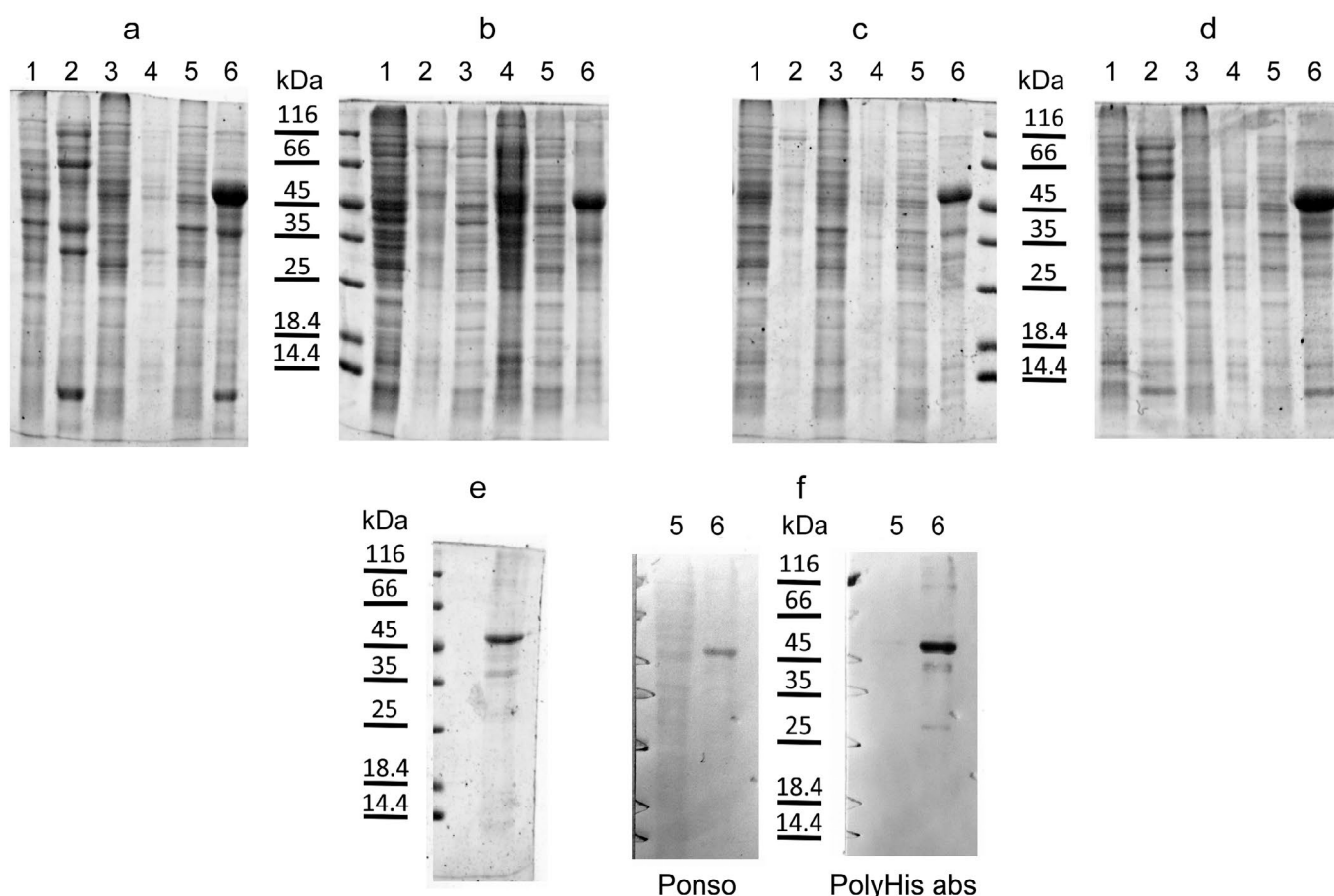


Рисунок 2. Экспрессия δ -латроинсектотоксина (δ -lit) *L. tredecimguttatus* в *E. coli*. а – экспрессия при комнатной температуре в анаэробных условиях; б – экспрессия при комнатной температуре в аэробных условиях; в – экспрессия при 37°C в анаэробных условиях; д – экспрессия при 37°C в аэробных условиях; е – С-концевой фрагмент δ -lit после растворения телец включения детергентом и диализа; ф – иммуноблоттинг С-концевого фрагмента δ -lit с антителами к полигистидиновой последовательности (PolyHis abs); 1, 2 – экспрессия полноразмерного токсина (фракция растворимых белков и не растворимый осадок после гомогенизации соответственно), 3, 4 – экспрессия N-концевого фрагмента δ -lit, 5, 6 – экспрессия С-концевого фрагмента δ -lit

Figure 2. Agarose gel electrophoresis showing expression of δ -latroinsectotoxin (δ -lit) from *L. tredecimguttatus* in *E. coli*. a) at room temperature under anaerobic conditions; b) at room temperature under aerobic conditions; c) at 37°C under anaerobic conditions; d) at 37°C under aerobic conditions; e) C-terminal fragment of δ -lit after solubilization of inclusion bodies with SDS detergent and dialysis; f) – immunoblotting of the C-terminal fragment of δ -lit with antibodies (abs) against the polyhistidine (PolyHis) sequence; 1, 2 – expression of the full-length toxin (soluble protein fraction and insoluble pellet after homogenization, respectively), 3, 4 – expression of the N-terminal fragment of δ -lit, 5, 6 – expression of the C-terminal fragment of δ -lit

в 43 кДА (рис. 3). Однако окрашивание с помощью полученной сыворотки выявило в данной пробе полосу соответствующего δ ЛИТ размера, а также ряд полос более низкой массы, отсутствующих в контроле (проба после экспрессии в тех же условиях другого белка). Помимо

токсина, окрашивание с помощью полученной сыворотки выявляло ряд бактериальных белков, что объясняется использованием для иммунизации бактериального гомогената, однако все эти белки окрашивались и в контрольной пробе.

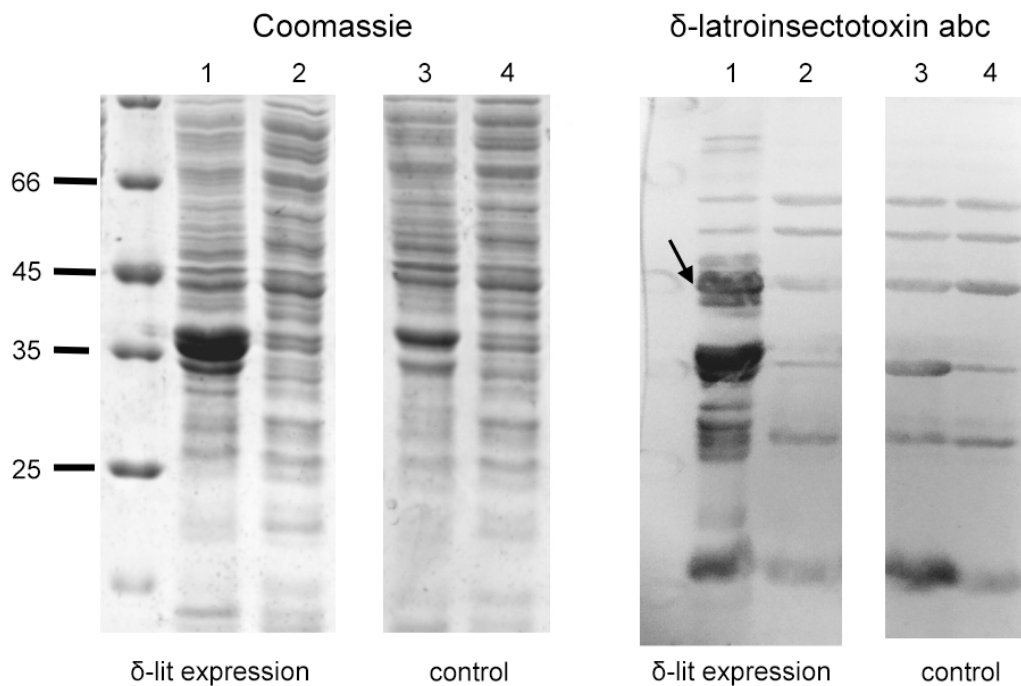


Рисунок 3. Проверка полученных антител (abs) с помощью иммуноблоттинга проб бактерий, экспрессирующих белок С-концевой участок дельта-латроинсектотоксина (δ -lit) без полигистидиновой и лидерных последовательностей. (1, 3 – нерастворимая фракция после гомогенизации бактерий, 2, 4 – супернатант, содержащий растворимые белки)

Figure 3. Verification of the antibodies (abs) obtained from immunized mice using immunoblotting of bacterial samples expressing the C-terminal region of δ -latroinsectotoxin (δ -lit) without the polyhistidine and leader sequences.

Lane 1, 3 – insoluble fraction after bacterial homogenization, 2, 4 – supernatant containing soluble proteins

Обсуждение

В рамках данной работы описан процесс получения поликлональных антител как первый этап изучения δ -латроинсектотоксина из яда паука *L. tredecimguttatus* в качестве эффекторной молекулы для генетической модификации энтомопатогенов. Данный процесс нам удалось осуществить без опасной для исследователей работы со смертельно ядовитым каракуртом. Данная задача была решена за счет химического синтеза кодирующей δ ЛИТ последовательности и иммунизации животных синтезированным в бактериальных клетках фрагментом молекулы. Авторы, впервые характеризовавшие изучаемый токсин, уже осуществляли его бактериальную экспрессию, однако крайне низкий уровень синтеза позволял провести лишь функциональный анализ рекомбинантного белка, но не использовать его для иммунизации. (Dulubova et al., 1996). Несмотря на то, что в этой работе мы использовали более современную и усовершенствованную систему бактериальной экспрессии, молекулярная масса токсина более чем в 120кДА делала незначительной вероятность добиться высокого уровня синтеза в бактериях (Verrow et al., 2006). По этой причине еще на этапе оптимизации кодонов для синтеза последовательности δ ЛИТ мы заложили в нее несколько сайтов распознавания ферментами рестрикции, не меняя аминокислотного состава соответствующего белка, что позволило клонировать в векторе для бактериальной

экспрессии как полноразмерный белок, так и его С- и N-концевые фрагменты.

Осуществив первичную экспрессию полноразмерного белка в стандартных условиях, описанных в инструкции к использованному вектору pRSET B и не наблюдая эффективного синтеза (результаты не указаны), мы приступили к подбору условий экспрессии и выбору оптимального фрагмента молекулы для синтеза. Для этого токсин и его концевые фрагменты экспрессировали при пониженном уровне индуктора экспрессии в разных условиях аэрации и температуры. Такие параметры были выбраны на основании прошлого опыта экспрессии потенциально токсичных для бактерий молекул из ядов членистоногих, вариация в которых может приводить к различному более чем на порядок уровню экспрессии (Timofeev et al., 2024). В том же исследовании мы показали, что для получения поликлональных антител достаточно синтезировать в бактериях антиген для иммунизации в нерастворимой форме с дальнейшим его растворением в детергенте с последующим диализом. Необходимой для этого уровень экспрессии можно определить за счет электрофореза гомогената бактерий после экспрессии с окрашиванием белков Ку-масси, и простого визуального анализа соотношения полос, соответствующих рекомбинантному белку и другим молекулам в гомогенате. Подобный анализ для δ ЛИТ и его

фрагментов показал, что необходимый уровень экспрессии наблюдается только для С-терминального фрагмента не зависимо от условий экспрессии. На основании этого С-терминальный фрагмент был использован в качестве антигена для иммунизации животных и получения поликлональных антител к δ ЛИТ.

Для проверки сыворотки, полученной после завершения цикла иммунизаций, на наличие в ней антител к δ ЛИТ, мы экспрессировали фрагмент δ ЛИТ с использованием модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом, содержащим так называемые лидерные последовательности: Полигистидиновый участок, T7 gene 10 leader, Xpresssm Eritore. Эти последовательности необходимы для обеспечения возможности идентификации и очистки рекомбинантного белка, а также для значительного увеличения уровня экспрессии. Однако этот участок обладает высокой иммуногенностью, и при иммунизации животных содержащим его белком могут образоваться антитела, специфичные к этому фрагменту (Dolgikh et al., 2022). Поэтому для доказательства создания антител к δ ЛИТ необходимо было показать распознавание ими этой молекулы без С-терминального тага. В рамках этой работы нам удалось установить, что полученная антисыворотка специфично окрашивает синтезированный в подобных условиях антиген, что подтверждает получение антител к рекомбинантному токсину. Для проверки специфичности

полученных антител необходимо будет продемонстрировать распознавание ими полноразмерного токсина, например, синтезированного с помощью бакуловирусной экспрессии в культуре клеток насекомых, что представляет будущую задачу этой работы при использовании δ ЛИТ для создания рекомбинантных бакуловирусов. Возможность такого синтеза функционально активной молекулы для сходного с δ ЛИТ α -латроинсектотоксина *L. tredecimguttatus* была установлена еще в прошлом веке (Kiyatkin et al., 1995).

Таким образом, на примере δ ЛИТ в этой работе мы описали простую и эффективную методику получения антител к высокомолекулярному токсину, синтез полноразмерной копии которого в бактериях оказался значительно затруднен. Метод исключает контакт со смертельно опасным членистоногим, позволяет использовать на всех этапах одну изначально синтезированную последовательность ДНК, не требует количественных методов определения уровня экспрессии белка, применения хроматографии или других методов для его очистки, и таким образом является максимально эффективным и экономящим время. Полученные в этой работе антитела в будущем позволят идентифицировать изучаемый белок при создании на его основе биоинсектицидов, например, генетически модифицированных энтомопатогенных грибов или вирусов.

Благодарности

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

Библиографический список (References)

- Дулубова ИЕ, Хвощев МВ, Красноперов ВГ, Галкина ТГ, Плужников КА, Волкова ТМ, Гришин ЕВ (1996) Первичная структура δ -латроинсектотоксина из яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. *Биоорганическая химия* 22(1):68–73
- Chen M, Blum D, Engelhard L, Raunser S, Wagner R, Gatsogiannis C (2021) Molecular architecture of black widow spider neurotoxins. *Nat Commun* 12(1):6956. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26562-8>
- Dulubova IE, Krasnoperov VG, Khvotchev MV, Pluzhnikov KA, Volkova TM, Grishin EV, Vais H, Bell DR, Usherwood PN (1996) Cloning and structure of delta-latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family: functional expression requires C-terminal truncation. *J Biol Chem* 271(13):7535–7543. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7535>
- Yan S, Wang X (2015) Recent advances in research on widow spider venoms and toxins. *Toxins* 7(12):5055–5067. <https://doi.org/10.3390/toxins7124862>
- Lovett B, St Leger RJ. (2018) Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Manag Sci* 74(4):781–789. <https://doi.org/10.1002/ps.4734>
- Berrow NS, Büssov K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers GE, Levy N, Lieu V, Owens, RJ, Peleg Y, Pinaglia C, Quevillon-Cheruel S, Salim L, Scheich C, Vincentelli R, Busso D (2006) Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr* 62:1218–1226. <https://doi.org/10.1107/S0907444906031337>
- Bobkova NV, Medvinskaya NI, Kamynina AV, Aleksandrova IY, Nesterova IV, Samokhin AN, Korojev DO, Filatova MP, Nekrasov PV, Abramov AY, Leonov SV, Volpina OM (2014) Immunization with either prion protein fragment 95-123 or the fragment-specific antibodies rescue memory loss and neurodegenerative phenotype of neurons in olfactory bulbectomized mice. *Neurobiol Learn Mem* 107:50–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.10.019>
- Dani MP, Richards EH (2010) Identification, cloning and expression of a second gene (vpr1) from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca* that displays immunosuppressive activity. *J Insect Physiol*. 56(2):195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.006>
- Dolgikh VV, Timofeev SA, Zhuravlyov VS, Senderskiy IV (2020) Construction and heterologous overexpression of two chimeric proteins carrying outer hydrophilic loops of *Vairimorpha ceranae* and *Nosema bombycis* ATP/ADP carriers. *J Invertebr Pathol* 171:107337. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107337>
- Dolgikh VV, Zhuravlyov VS, Senderskiy IV, Ignatieva AN, Timofeev SA, Seliverstova EV (2022) Heterologous expression of scFv fragment against *Vairimorpha (Nosema) ceranae* hexokinase in Sf9 cell culture inhibits microsporidia intracellular growth. *J Invertebr Pathol* 191:107755. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107755>
- He Q, Duan Z, Yu Y, Liu Z, Liu Z, Liang S (2013) The venom gland transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. *PLoS One* 8(11):e81357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081357>

- Kiyatkin NI, Kulikovskaya IM, Grishin EV, Beadle DJ, King LA (1995) Functional characterization of black widow spider neurotoxins synthesised in insect cells. *Eur J Biochem* 230(3):854–859. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20628.x>
- Koller J, Sutter L, Gonthier J, Collatz J, Norgrove L (2023) Entomopathogens and Parasitoids Allied in Biocontrol: A Systematic Review. *Pathogens* 12:957. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070957>
- Kroemer JA, Bonning BC, Harrison RL (2015) Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses. *Viruses* 7(1):422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
- Kumar, S.; Singh, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects (2015) *J Fertil Pestic* 6:1–2. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000e129>
- Moscardi F (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 44: 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257>
- Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA (2007) Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon* 49(4):531–549. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.021>
- Timofeev SA, Shukhalova AG, Senderskiy IV, Mtitina GV, Gannibal FB, Dolgikh VV (2024) Two insecticidal neurotoxins from parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* venom and their potential use in biocontrol. *BioControl* 69:65–75. <https://doi.org/10.1007/s10526-023-10238-x>
- Torres SL, Landeros A, Penhallegon EJ, Salazar K, Porter LM (2022) Expression of Brown and Southern Black Widow Spider (Araneae: Theridiidae) Latrotoxins Is Tissue- and Life Stage-Specific for α -Latroinsectotoxins and δ -Latroinsectotoxins and Is Ubiquitous for α -Latrotoxins. *J Med Entomol* 59(1):184–191. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab168>
- Wang X, Tang X, Xu D, Yu D (2019) Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from *Latrodectus* spiders. *Pest Manag Sci* 75(2):318–323. <https://doi.org/10.1002/ps.5206>
- Wang XC, Duan ZG, Yang J, Yan XJ, Zhou H, He XZ, Liang SP (2007) Physiological and biochemical analysis of *L. tredecimguttatus* venom collected by electrical stimulation. *J Physiol Biochem* 63(3):221–230. <https://doi.org/10.1007/BF03165785>

Translation of Russian References

- Dulubova IE, Khvotchev MV, Krasnoperov VG, Galkina TG, Pluzhnikov KA Volkova TM, Grishin EV (1996) Primary structure of delta-latroinsectotoxin from venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider. *Russ. J. Bioorg. Chem* 22(1):68–73

Plant Protection News, 2024, 107(3), p. 130–136

OECD+WoS: 1.06+QU (Microbiology), 2.08+DB (Biotechnology & Applied Microbiology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2024-107-3-16655>

Full-text article

SELECTION OF A Δ -LATROINSECTOTOXIN FRAGMENT FROM *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* VENOM FOR EFFICIENT BACTERIAL EXPRESSION

S.A. Timofeev^{1*}, A.G. Shukhalova¹, O.A. Pavlova^{1,2}

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: ts-bio@ya.ru

Toxins from the venom of predatory and parasitoid arthropods, such as scorpions, spiders, and parasitoid wasps, are used as promising tools in plant protection against insect pests. In many cases, polyclonal antibodies can be created to study a single molecule in the laboratory, which allows for specific methods of detection and purification. In the present study, heterologous expression of δ -latroinsectotoxin from the venom of the black widow spider *Latrodectus tredecimguttatus*, as well as its N- and C- terminal fragments, was carried out in *Escherichia coli* cells at various temperatures and aeration conditions. Regardless of the expression conditions, the accumulation of the recombinant protein in large quantities in the bacterial cells as inclusion bodies was observed only for the C-terminal fragment of the toxin. The high efficiency of expression of this fragment allowed the use of the insoluble protein fraction of the bacterial homogenate for the immunization of mice and the production of antibodies to δ -latroinsectotoxin. The antigen-binding activity of the immunoglobulins was confirmed by immunoblotting of the synthesized toxin fragment in bacteria using a vector with removed leader sequences. The antibodies obtained can be used to detect the black widow spider toxin during its expression in various systems, such as in the creation of genetically modified entomopathogenic fungi or viruses.

Keywords: biological plant protection, heterologous expression, polyclonal antibodies

Submitted: 13.08.2024

Accepted: 15.10.2024