



FUNKČNÍ VZOREK

**Multiplexní PCR pro určení bakterií
Bacillus thuringiensis serovar israelensis**

**Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat
Mgr. Helena Juřicová, Ph.D.**

6706
2024

Funkční vzorek 6706/2024

Multiplexní PCR pro určení bakterií *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis

Autoři

Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat

Mgr. Helena Juřicová, Ph.D.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu institucionální podpory Ministerstva
zemědělství RO0523.**

2024

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

ISBN: 978-80-7672-067-2

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Předmět funkčního vzorku.....	3
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku.....	4
3.1. Předmluva.....	4
3.2. Metodika funkčního vzorku.....	4
3.2.1. Izolace DNA.....	5
3.2.2. Návrh primerů pro multiplexní PCR.....	5
3.2.3. Parametry PCR.....	6
3.3. Vyhodnocení funkčnosti systému.....	6
3.4.1. Skladování jednotlivých komponent.....	7
4. Srovnání „novosti postupů“.....	8
5. Uplatnění funkčního vzorku.....	8
6. Ekonomické aspekty.....	8
7. Seznam použité literatury.....	9

1. Úvod

Rod *Bacillus* je jedním z dominantních bakteriálních rodů vyskytujících se v půdě. Jedná se o tyčinkovité, aerobní nebo fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie tvořící endospory. Zástupci *Bacillus* spp. se vyznačují obrovskou genetickou a metabolickou rozmanitostí a v půdním ekosystému plní řadu funkcí, od koloběhu živin až po toleranci rostlin vůči stresu¹.

Bakteriální druh *B. thuringiensis* (Bt) je členem skupiny *B. cereus* (Bcg – *Bacillus cereus* group), kterou tvoří druhy *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis*²⁻⁴. S výjimkou *B. cytotoxicus* jsou genomy Bcg vysoce konzervované, s velikostí chromozomu 5,2 – 5,9 Mb. *B. thuringiensis* byl poprvé izolován v roce 1901 z infikované larvy bource morušového (*Bombyx mori*) a následně z larvy zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) získaného v mlýnu nacházejícím se ve spolkové zemi Durynsko (Thuringia), odkud pochází jeho název⁴. Na základě jeho entomopatogenních vlastností byl *B. thuringiensis* komercializován a používán v zemědělství, zejména jako ochrana proti škůdcům z řádu motýlů (*Lepidoptera*). *B. thuringiensis* serovar israelensis, efektivní vůči komárům, byl objeven v roce 1977. Mechanismus účinku je založen na produkci krystalického Cry proteinu (řadícího se mezi δ -endotoxiny) vznikajícího v průběhu sporulace. Tento protein poškozuje peritrofickou membránu a způsobí pomocí osmotického šoku lyzi intersticiálních buněk hmyzu, což následně vede k jeho smrti⁴.

V současnosti biopesticidy založené na použití *B. thuringiensis* tvoří přibližně 75 % celosvětového trhu s bioinsekticidy a reprezentují asi 4 % celkových insekticidů⁴.

Detekce přítomnosti Bt v prostředí byla často založená na kultivaci na selektivních médiích, následně v kombinaci s identifikací *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis (Bti) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), sérotypové charakterizace a/nebo pomocí genotypizace polymorfizmů délky fragmentů⁵.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo navrhnout vhodnou metodu, která pomocí konvenční PCR umožní spolehlivě detekovat druh *B. thuringiensis* serovar israelensis a odlišit jej od jiných druhů řadících se do skupiny *B. cereus*. Navrhovaná metoda umožní v jedné PCR reakci určit přítomnost cílové sekvence pro skupinu *B. cereus*, cílové sekvence pro *B. thuringiensis* serovar

israelensis a přítomnost plazmidově vázaného genu kódujícího Cry4A protein, který je zodpovědný za insekticidní efekt.

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

3.1. Předmluva

Identifikace *B. thuringiensis* serovar israelensis ze vzorků z prostředí probíhá nejčastěji pomocí kultivačních metod. U těchto technik je, kromě relativně dlouhé doby potřebné pro pomnožení, nevýhodou také jejich nízká citlivost a morfologická podobnost *B. cereus* a *B. thuringiensis*. *cry* geny jsou často využívány jako markery, které umožňují rozlišení mezi *B. thuringiensis* a *B. cereus* pomocí PCR. Jelikož jsou ale lokalizovány na plazmidech, nemusí být přítomnost *cry* genu směrodatná⁵. Proto je důležité vybrat vhodný cíl specifický pro Bti a nacházející se na bakteriálním chromozomu. Ve studii Schneider et al. (2015)⁵ byla jako místo vhodné pro chromozomální detekci identifikována intergenická oblast nacházející se mezi genem *BTF_16195* kódujícím protein COG1396 obsahující DNA vazební doménu a genem kódujícím hypotetický protein COG 1396.

3.2. Metodika funkčního vzorku

Předmětem metodiky funkčního vzorku je návrh sady primerů zacílených na 452 bp dlouhou intergenovou oblast, specifickou pro *B. thuringiensis* serovar israelensis, které mohou sloužit pro účely identifikace *B. thuringiensis* serovar israelensis z bakteriální kultury nebo ze směsi lyofilizovaných bakterií. Pro návrh primerů byla stanovena následující kritéria: 1. Možnost použití v multiplexní PCR a z toho plynoucí - 2. Velikost produktu kolem 300 bp (velikost byla volena tak, aby bylo možné spolehlivě oddělit jednotlivé produkty pomocí elektroforézy); 3. Primery s vyšší teplotou tání pro specifický annealing (65 °C) a; 4. Poměr jednotlivých primerových párů specifických pro skupinu *B. cereus* a pro *B. thuringiensis* serovar israelensis vůči sobě. Navržená sada primerů byla zakomponována do triplexní PCR, která má za cíl identifikovat, zda se v testovaném vzorku vyskytuje druh patřící do skupiny *B. cereus*, a v rámci ní, zda se jedná o serovar israelensis. Dále je možné sledovat, zda je v testovaném vzorku přítomná sekvence dokazující přítomnost *cry4A* genu lokalizovaného na plazmidu a případný entomopatogenický (insekticidní) efekt testovaného vzorku.

3.2.1. Izolace DNA

Pro izolaci bakteriální DNA z bakteriální kultury byly použity dva způsoby izolace: izolace varem nebo izolace pomocí izolační soupravy. Pro izolaci z bakteriální kultury je kvalita DNA získaná izolací varem postačující, zatímco pro přímou izolaci z reálných vzorků (lyofilizovaný směsný přípravek používaný v zemědělství) je vhodnější izolace pomocí izolační soupravy. Pro vzorky bioinsekticidních přípravků dostupných zejména v sypké formě byla použita izolace pomocí QiaAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen).

U sypkých směsí byl připraven 10% (w/v) roztok sypkého přípravku ve fosfátovém tlumivém roztoku (PBS). Z této suspenze bylo odebráno 1 ml homogenátu, který byl následně centrifugován při otáčkách 7200 g po dobu 10 minut. U tekutých směsí byl pro izolaci DNA použit pelet vzniklý centrifugací 3 ml roztoku při otáčkách 7200 g po dobu 10 min. Získaný pelet byl použit pro izolaci QiaAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen) dle návodu výrobce a DNA byla eluována do 100 µl elučního roztoku. Pro následnou PCR byly použity 2 µl DNA.

3.2.2. Návrh primerů pro multiplexní PCR

K průkazu přítomnosti bakterií řadících se do skupiny *B. cereus* byla optimalizována PCR dostupná v literatuře⁵. Paralelně byla optimalizována PCR pro detekci genu pro toxin Cry4 s primery z literatury^{6,7}. Primery pro detekci *B. thuringiensis* serovar israelensis byly navrženy *de novo* a byly zacíleny na chromozom Bti do 452 bp dlouhé intergenové oblasti mezi potenciálním regulátorem transkripce a hypotetickým proteinem, která je specifická pro serovar israelensis⁵.

Pro návrh sady primerů specifických pro Bti bylo třeba dodržet kritérium délky amplifikačního produktu tak, aby měl produkt velikost odlišnou od dalších cílů (250 bp; 158 bp; Tab. 1), a teplota pro nasedání primerů byla 65 °C.

Tabulka 1: Přehled sekvencí primerů použitých v multiplexu a jejich původ

název	Sekvence 5→3	Tm	velikost	zdroj
Bcg_1F	AAC AGG CTC CAT ACA ATG GTA T	65°C	250 bp	Schneider et al., 2015 ⁵
Bcg_1R	TGG TAG CGT TTC TTC GTC TTA T			
Cry_4F	GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC	65°C	158 bp	Guidi et al., 2010 ⁷
Cry_4R	ACC TGG AAC ATC TGA CAA CCA ATC			
Bti_65_2F	GTT GCG ATT GTG TTA TAT AGC GGT TT	65°C	281 bp	vlastní návrh
Bti_65_3R	ACA ACA TAT ACT GTG TGG GAT GCT TAT			

Pomocí nástroje Primer-BLAST bylo vygenerováno deset párů primerů, které splňují uvedená kritéria. Vzhledem k zastoupení nukleotidů v uvedené sekvenci bylo nutné zvýšení počtu nukleotidů v primerových párech na 26, resp. 27. Z těchto deseti navržených párů byl následně pomocí nástroje OligoAnalyzer ® (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) vybrán nejvhodnější pár (teplota tání 65 °C, obsah GC nukleotidů max 50 %, minimální tvorba vlásenek, selfdimérů a heterodimérů). Sekvence primerů použité v triplexové PCR jsou uvedeny v tabulce 1.

3.2.3. Parametry PCR

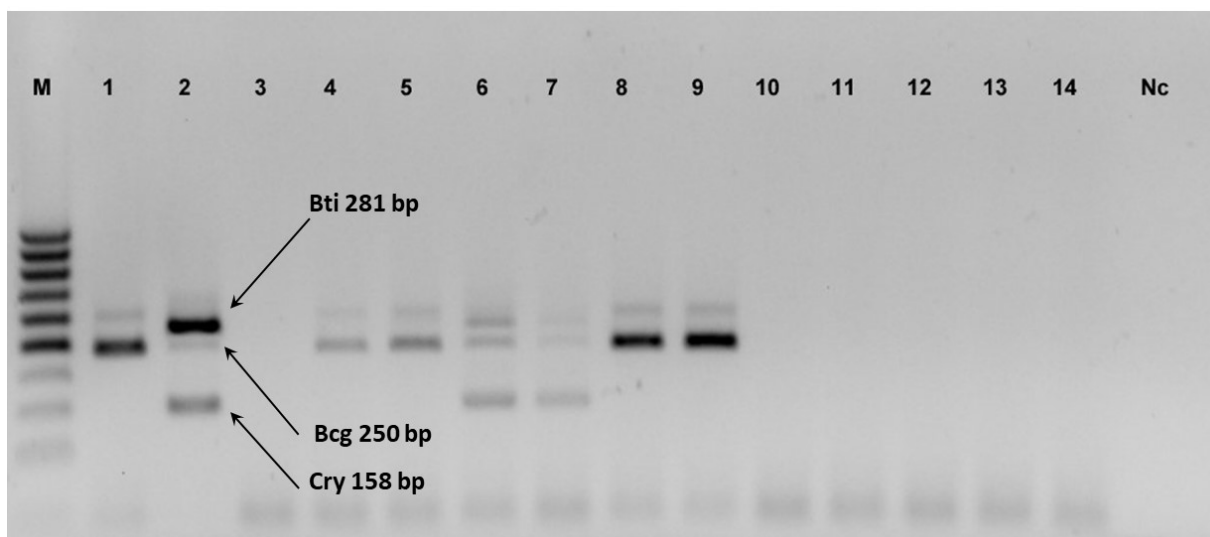
PCR reakce byla provedena s použitím předpřipraveného premixu (PPP Mastermix, TopBio). Pro optimální detekci všech sledovaných produktů bylo potřebné upravit poměry jednotlivých komponent ve směsi. Použité množství primerů a parametry PCR jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení PCR reakční směsi a parametry PCR reakce

Složení PCR reakční směsi / vzorek		Parametry PCR reakce			
			Teplota	Čas	Počet cyklů
PPP MasterMix	12,5 µl	Úvodní denaturace	95°C	5 min	1
Bcg_1F	2 µM				
Bcg_1R	2 µM	Denaturace	95°C	30 sec	35
Cry_4F	0,14 µM	Annealing	65°C	20 sec	
Cry_4R	0,14 µM	Extenze	72°C	30 sec	
Bti_65_2F	0,8 µM	Finální extenze	72°C	7 min	1
Bti_65_3R	0,8 µM	Chlazení	14°C	dle potřeby	
H ₂ O	ad 23 µl				
DNA	2 µl				

3.3. Vyhodnocení funkčnosti systému

Funkčnost existujícího systému byla ověřena použitím panelu reálných vzorků (lyofilizované směsné přípravy s označením LEV 37/24, LEV 74/24, LEV 69/24) a izolátů rodu *Bacillus*, konkrétně druhů *B. cereus*, *B. thuringiensis* serovar israelensis, *B. thuringiensis* serovar kurstaki, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* a *B. circulans*. Výsledky jsou uvedeny na obr. 1.



Obrázek 1: Elektroforetické rozdělení PCR produktů získaných pomocí navržené triplexové reakce. 2% agarózový gel v TBE, 75 min, 135V, barvené Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics JAPAN, Japonsko).
 Legenda: M, 50bp – 500 bp marker (Roth); 1. LEV 37/24 směs lyofilizovaných bakterií skupiny *B. cereus*; 2. LEV 74/24 směs lyofilizovaných bakterií skupiny *B. cereus*; 3. LEV 69/24 směs lyofilizovaných bakterií *B. amyloliquefaciens*; 4. *B. cereus* izolát M3; 5. *B. cereus* izolát M4; 6. *B. thuringiensis* serovar israelensis izolát M2; 7. *B. thuringiensis* serovar israelensis izolát M3; 8. *B. thuringiensis* serovar kurstaki izolát M1; 9. *B. thuringiensis* serovar kurstaki izolát M4; 10. *B. subtilis*; 11. *B. megaterium*; 12. *B. licheniformis*; 13. *B. pumilus*; 14. *B. circulans*; Nc, negativní kontrola.

Vzorky nanesené v dráhách 1-3 představují reálné lyofilizované přípravky obsahující směs různých druhů bacilů. Přípravek s označením LEV 74/24 (dráha 2) obsahuje cílovou sekvenci *B. thuringiensis* serovar israelensis, jako i sekvence pro detekci skupiny *B. cereus* a Cry protein. Přípravek s označením LEV 37/24 (dráha 1) obsahuje pouze sekvenci pro skupinu *B. cereus*, ale ne pro *B. thuringiensis* serovar israelensis a přípravek LEV 69/24 (*B. amyloliquefaciens*, dráha 3) neobsahuje ani jednu ze sledovaných sekvencí. Je možné zřetelně odlišit *B. thuringiensis* serovar israelensis (dráha 6 a 7) od jiných zástupců skupiny *B. cereus* (*B. cereus* – dráha 4 a 5, *B. thuringiensis* serovar kurstaki – dráha 8 a 9), i od jiných zástupců rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans* – dráhy 10 – 14). Jako negativní kontrola je v ekvivalentním vzorku použita voda pro PCR.

3.4.1. Skladování jednotlivých komponent

Reakční směs pro triplexní PCR se uchovává v malých poměrných objemech zamrazena na -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců a lze ji opakovaně rozmrazovat a zamrazovat. DNA použitá pro pozitivní kontrolu je skladována v poměrných objemech na -20°C.

4. Srovnání „novosti postupů“

Identifikace Bti se dlouho zakládala zejména na kultivačním průkazu, následně v kombinaci s PCR detekcí *Cry4A* genu, sérotypovou charakterizací a/nebo genotypovou analýzou polymorfizmů délky fragmentů. Rychlá a dostupná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) také nedokáže spolehlivě určit Bti, často tuto bakterii identifikuje jen jako bakterii skupiny *B. cereus*. Doposud používaná PCR detekce založená na detekci genu kódujícího Cry4A protein není v důsledku vysoce pravděpodobného horizontálního transferu plazmidů úplně spolehlivá. Navrhovaná detekce Bti pomocí PCR detekující chromozomální úsek Bti tento problém překlenuje a umožňuje spolehlivé rozlišení od jiných zástupců rodu *Bacillus*.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je určen pro stanovení přítomnosti chromozomálního úseku DNA charakteristického pro *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis a umožní jeho spolehlivé odlišení od jiných zástupců druhů *B. cereus*. Dále je možná detekce sekvence kódující Cry 4A protein, který je odpovědný za insekticidní účinek *B. thuringiensis* serovar israelensis. Funkční vzorek bude uplatněn v rámci portfolia laboratoří Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře se týkají pořízení spotřebního materiálu, chemikálií a souprav pro základní kultivaci, izolaci nukleových kyselin a na provedení PCR. Jiné náklady spojené s nákupem drobného hmotného majetku nutného na provedení metody (pipety, centrifugy apod.) ani náklady na velké přístroje (chlazená centrifuga, thermocycler) nejsou zahrnuty, neboť jsou v současnosti standardním vybavením laboratoře. Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky jsou 300 Kč bez DPH.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu institucionální podpory Ministerstva zemědělství RO0523.

7. Seznam použité literatury

- (1) Saxena, A. K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D. J. Bacillus Species in Soil as a Natural Resource for Plant Health and Nutrition. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128* (6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>.
- (2) Guinebreière, M.-H.; Thompson, F. L.; Sorokin, A.; Normand, P.; Dawyndt, P.; Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Sanchis, V.; Nguyen-The, C.; Heyndrickx, M.; De Vos, P. Ecological Diversification in the Bacillus Cereus Group. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10* (4), 851–865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>.
- (3) Vilas-Bôas, G. T.; Peruca, A. P. S.; Arantes, O. M. N. Biology and Taxonomy of Bacillus Cereus, Bacillus Anthracis, and Bacillus Thuringiensis. *Can. J. Microbiol.* **2007**, *53* (6), 673–687. <https://doi.org/10.1139/W07-029>.
- (4) Ehling-Schulz Monika; Lereclus Didier; Koehler Theresa M. The Bacillus Cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7* (3), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>.
- (5) Schneider Salome; Hendriksen Niels B.; Melin Petter; Lundström Jan O.; Sundh Ingvar. Chromosome-Directed PCR-Based Detection and Quantification of Bacillus Cereus Group Members with Focus on B. Thuringiensis Serovar Israelensis Active against Nematoceran Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (15), 4894–4903. <https://doi.org/10.1128/AEM.00671-15>.
- (6) Guidi Valeria; Patocchi Nicola; Lüthy Peter; Tonolla Mauro. Distribution of Bacillus Thuringiensis Subsp. Israelensis in Soil of a Swiss Wetland Reserve after 22 Years of Mosquito Control. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (11), 3663–3668. <https://doi.org/10.1128/AEM.00132-11>.
- (7) Guidi, V.; De Respinis, S.; Benagli, C.; Lüthy, P.; Tonolla, M. A Real-time PCR Method to Quantify Spores Carrying the Bacillus Thuringiensis Var. Israelensis Cry4Aa and Cry4Ba Genes in Soil. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109* (4), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04741.x>.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz