

УДК 579.25

И. Н. АНАНЬЕВА, И. Э. РУБЕЛЬ, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ, Э. И. КОЛОМИЕЦ, М. А. ТИТОК

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ CRY-ГЕНОВ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: titok@bsu.by

(Поступила в редакцию 18.12.2014)

Введение. Получение высококачественных и экологически чистых продуктов питания – первоочередная задача высокоразвитого сельскохозяйственного производства. Рациональный севооборот и своевременное внесение удобрений являются основой высокого урожая, однако не могут полностью решить проблем, связанных с болезнями сельскохозяйственных растений. Для защиты растений от патогенов и вредителей все большее внимание уделяется использованию биопестицидов. Эффективными и широко применяемыми средствами борьбы с насекомыми-вредителями являются препараты на основе бактерий *Bacillus thuringiensis*. Однако данные микроорганизмы способны продуцировать широкий спектр соединений, ряд из которых (например, экзотоксины) обладают неспецифическим эффектом, вызывая гибель клеток животных различных таксономических групп. В связи с этим весьма перспективными представляются исследования по конструированию штаммов с инсектицидной активностью направленного действия для последующего их биотехнологического использования.

Цель работы – молекулярно-генетический и функциональный анализ генетических детерминант природных бактерий *B. thuringiensis*, обеспечивающих синтез токсинов специфического действия.

Материалы и методы исследования. В работе использовали бактерии *Escherichia coli* XL1-Blue (F⁺: Tn10(Tc^R) *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ(*lacZ*)M15/*recA1 endA1, gyrA96*(Nal^R) *thi hsdR17* (r_k⁻m_k⁺) *glnV44 relA1 lac*) [1], *B. thuringiensis* БИМ В-711 Д, *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д из коллекции Института микробиологии НАН Беларуси (штаммы выделены в Каменецком районе Брестской области из тел личинок майского жука), типовой штамм *B. subtilis* 168 [2], а также плазмиды pAL1 [3] и pMUTIN4 [4].

Бактерии выращивали в полноценной среде LB [5]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агар-агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0,2 %. В работе использовали коммерческий препарат ампициллина, хлорамфеникола и эритромицина в концентрации 100, 5 и 50 мкг/мл соответственно. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) производства Thermo Scientific готовили согласно рекомендациям изготовителя (концентрация 0,5 мМ и 50 мкг/мл соответственно).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реактивов производства «Праймтех» (Беларусь). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 1 единицу *Taq*-полимеразы (или *Pfu*-полимеразы), 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 3 % глицерина и буфер.

Геномную ДНК выделяли саркозидовым методом [6].

Праймеры. Для постановки ПЦР использовали праймеры, характеристика которых приведена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Генетическая детерминанта	Нуклеотидная последовательность праймера (приведена в направлении 5'→3')	Размер продукта ПЦР, п. н.	Лит. источник
Последовательности хромосомы	Bc-Rep1 – attaaagtttcactttat Bc-Rep2 – tttaatcagtgagg		[7]
Фрагмент гена <i>cryI</i>	CJI-1 – tgtagaagaggaagtctatcca CJI-2 – tatcggtttctgggaagta	272–290	[8]
Фрагмент гена <i>cry3</i>	FUn3 – cgttatcgcagagatgacattaac RUn3 – catctgtgttctggaggcaat	589–604	[8, 9]
Фрагменты генов <i>cry7</i> , <i>cry8</i>	CJIII20 – ttaaccgtttctgcagaga CJIII21 – tcgcacttctatgtgtccaag	694–733	[8]
	Fun7,8 – aagcagtgaaatcctgtttac Run7,8 – ctctaaacctgactact	420–423	
Фрагменты генов <i>cry1–cry4</i> , <i>cry7–cry9</i> , <i>cry11</i> , <i>cry14</i>	OL2 – agagahrtdahrgtdahrgtatttrgat OL4 – agcatadcgrahncyhrydyvata	519–942	[9]
Ген <i>cryIe</i>	2cry1-f – gtagattataaacacctgg 2cry1-r – tatcactcgttaaatcatac	3844	Данная работа
Ген <i>cryIa</i>	24cry1-f – aagagatggaggtaacttatgg 24cry1-r – tctctgcttgattaagttgc	3733	Данная работа

Для амплификации фрагментов хромосомы (Rep-ПЦР) с помощью праймеров Bc-Rep1 и Bc-Rep2 использовали режимы: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 1 мин, 42 °C – 1 мин, 72 °C – 1,5 мин (35 циклов); 72 °C – 7 мин (1 цикл).

Для амплификации генов семейства *cryI* с помощью праймеров CJI-1 и CJI-2 использовали режимы: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (7 циклов); 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (20 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации генов семейства *cry3* с помощью универсальных праймеров FUn3 и RUn3 использовали режимы: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (7 циклов); 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (20 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации генов семейства *cry3* с помощью праймеров CJIII20 и CJIII21 использовали режимы: 95 °C – 3 мин (1 цикл); 95 °C – 30 с, 49 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (7 циклов); 95 °C – 30 с, 57 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (20 циклов); 72 °C – 12 мин (1 цикл).

Для амплификации генов семейства *cry7* и *cry8* с помощью универсальных праймеров Fun7,8 и Run7,8 использовали режимы: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 68 °C – 1 мин (7 циклов); 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 68 °C – 1 мин (20 циклов); 68 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации генов семейств *cry1–cry4*, *cry7–cry9*, *cry11*, *cry14* с помощью праймеров OL2 и OL4 использовали режимы: 94 °C – 2 мин (1 цикл); 94 °C – 45 с, 37 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин (35 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл).

Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

Рестриктию плазмидной ДНК, лигирование осуществляли ферментами в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (Thermo Scientific). Продукты амплификации выделяли из агарозного геля с использованием набора реактивов Kit GeneClean Spin (MP Biomedicals, США). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве [5]. В качестве реперной ДНК использовали DNA Ladder 1 kb Mix (Thermo Scientific).

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК осуществляли методом электропорации с помощью прибора MicroPulser (БИО-RAD, США) и кювет с расстоянием между электродами 1 мм при следующем режиме: напряжение 1,8 кВ в течение 5 мс. Трансформацию бактерий *B. subtilis* осуществляли методом, описанным в работе [2].

Сиквенс-анализ. В качестве матрицы для секвенирующей реакции использовали плазмидную ДНК. Для постановки секвенирующей реакции использовали набор реактивов Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Affymetrix) и стандартные праймеры M13f и M13r, меченные флуоресцентными метками IRDye 700 или IRDye 800. Секвенирование проводили по методу Сенгера согласно протоколу, описанному в инструкции. Продукты секвенирующей реакции анализировали с по-

мощью прибора 4300 DNA Analyzer (LI-COR, США), используя программное обеспечение e-Seq™ DNA Sequencing Software Version 3.1. Результаты анализировали с помощью компьютерной программы BLASTN 2.2.1 [10].

Инсектицидную активность проверяли на личинках вошинной моли (*Galleria mellonella* L.). Для этого бактерии *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д, *B. subtilis* 168/pAL1 и *B. subtilis* 168/pAL1-*cryIE* культивировали в течение 3 сут на среде, содержащей кормовые дрожжи (25 г/л), муку ржаную обдирную (30 г/л), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (1,5 г/л), $(NH_4)_2SO_4$ (1,5 г/л). Культуральную жидкость (5 мл) трижды отмывали физиологическим раствором, концентрировали в 5 или 10 раз и добавляли в корм личинкам вошинной моли (*Galleria mellonella* L.). Результаты учитывали через 5 сут.

Результаты и их обсуждение. Для первичной характеристики бактерий *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д и *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д применяли одну из разновидностей техники фингерпринта (так называемую Rep-ПЦР). Для этого использовали праймеры, комплементарные повторяющимся палиндромным последовательностям длиной 26 п. н. (Rep-последовательностям), характерным для генома бактерий рода *Bacillus*. Показано, что данный тип ПЦР является весьма информативным, поскольку позволяет не только выявить отличия в генетической организации исследуемых микроорганизмов, но и охарактеризовать тип их биологической активности [7]. Среди бактерий *B. thuringiensis* выделяют более 80 сероваров, обладающих инсектицидной активностью против насекомых различных таксономических групп (например, представителей отрядов Двукрылые, Жесткокрылые, Чешуекрылые и др.). Электрофоретический анализ продуктов Rep-ПЦР позволил установить, что исследуемые бактерии *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д и *B. thuringiensis* БИМ В-335 отличаются генетической организацией (рис. 1). При этом образование ампликонов размером от 1500 до 2000 п. н. могло свидетельствовать в пользу присутствия в клетках данных микроорганизмов генетических детерминант, определяющих инсектицидную активность против насекомых отряда Чешуекрылые [7]. Наличие продуктов амплификации других размеров (от 300 до 1000 п. н.) не исключало возможности присутствия генов, обеспечивающих синтез дополнительных токсичных соединений как направленного, так и неспецифического действия (рис. 1) [7].

Следует отметить, что практически все исследованные бактерии *B. thuringiensis* содержат одновременно несколько типов генетических детерминант, определяющих их инсектицидные свойства, большинство из которых имеет плазмидную локализацию [11]. При этом многие штаммы способны синтезировать экзотоксины, оказывающие летальный эффект на животные клетки вне зависимости от их таксономического статуса (в частности, на клетки насекомых, нематод, млекопитающих) [12].

Для выявления в геноме бактерий *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д и *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д генов, детерминирующих синтез определенных типов токсинов, использовали традиционную технику ПЦР с использованием праймеров, обеспечивающих амплификацию ряда *cry*-генов (*cry1-cry4*, *cry7*, *cry9*, *cry11*, *cry14*). В результате этих экспериментов только с использованием праймеров СЛ-1 и СЛ-2 были получены незначительно отличающиеся по размеру продукты амплификации (рис. 2), что свидетельствовало о присутствии в клетках исследуемых бактерий генов *cry1*.

Полученные продукты амплификации вырезали из геля и определяли их нуклеотидные последовательности. Для штамма *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д секвенированная последовательность проявляла наибольшую степень гомологии (98 % идентичности) с 3'-концевой последовательностью генов *cry1E*, депонированных в ГенБанке NCBI (JQ652456.1, X56144.1, M73252.1, EU244426.1, AY894137.1, HQ435318.1, X53985.1, U94323.1, AF202531.1). Все белки, детерминируемые данными генетическими детерминантами, имеющими достоверное сходство с секвенированной последовательностью из штамма *B. thuringiensis*

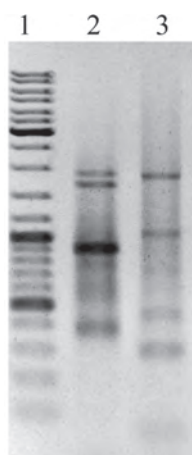
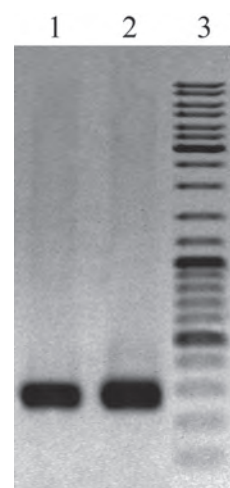


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов Rep-ПЦР. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК штаммов: 2 – *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д; 3 – *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д; 1 соответствует DNA Ladder Mix

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *cryI*. Номера дорожек соответствуют продуктам амплификации, полученным при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК штаммов: 1 – штамм *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д; 2 – штамм *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д; 3 – соответствует реперу DNA Ladder Mix



БИМ В-787 Д, состояли из 1171 аминокислоты и определяли инсектицидную активность против насекомых отряда Чешуекрылые и нематод.

С использованием в качестве матрицы тотальной ДНК штамма *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д с праймерами CJ1-1 и CJ1-2 в ПЦР был получен продукт амплификации, размер которого несколько отличался от такового для штамма *B. thuringiensis* БИМ В-711 Д. Анализ его нуклеотидной последовательности позволил установить, что она проявляет 95 % идентичности с большим числом генетических детерминант типа *cryIA* из базы данных ГенБанка. Следует отметить, что последовательности генов *cryIA* характеризуются большим разнообразием и детерминируют синтез 9 типов белковых токсинов (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah и Cry1Ai) [13]. Секвенированная последовательность выявила одинаковую степень гомологии с генами, определяющими синтез белков Cry1Aa (1176 аминокислотных остатков) и Cry1Ac (1178 аминокислотных остатков). Данные белки отличаются размерами и отдельными аминокислотными заменами, но характеризуются одинаковой биологической активностью – проявляют токсическое действие против насекомых отряда Чешуекрылые.

Таким образом, сиквенс-анализ исследованных последовательностей выявил их достоверное сходство с известными генами, детерминирующими белковые токсины Cry1E (для штамма *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д) и Cry1A (для штамма *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д). На основании полученных результатов можно утверждать, что инсектицидная активность штамма *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д против насекомых отряда Чешуекрылые обусловлена присутствием в их геноме гена *cryIA*. Для штамма *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д присутствие детерминанты, гомологичной гену *cryIE*, может определять инсектицидную активность против чешуекрылых и/или нематод.

Для дальнейшего функционального анализа использовали одну из выявленных *cry*-детерминант (*cryIE*), поскольку содержащий ее штамм *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д характеризовался более выраженной инсектицидной активностью против насекомых отряда Чешуекрылые. На основании проведенного сиквенс-анализа были сконструированы праймеры, позволившие амплифицировать ген *cryIE* с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток бактериальных хозяев. При этом изолированная последовательность гена *cryIE* размером 3844 п. н. содержала открытую рамку считывания (RBS-сайт и кодирующая последовательность), а также промоторную и терминаторную последовательности, которую встраивали в SmaI-сайт вектора pAL1 (гибридную конструкцию анализировали с помощью рестрикционного и сиквенс-анализа).

Известно, что транскрипция *cryI*-детерминант позитивно регулируется факторами споруляции (σ^E и σ^K), поэтому синтез токсинов семейства Cry1 в аспоровых штаммах не происходит [14]. Следует отметить, что первые попытки получить штамм бактерий *B. subtilis* 168, продуцирующий функциональный инсектицидный токсин Cry1, не увенчались успехом. Авторы использовали для транскрипции *cryI*-гена плазмидной локализации различные промоторные участки (*veg*, *43*, *ctc* и *spoVG*). При этом значительное количество целевого белка синтезировалось в клетке на определенной стадии клеточного цикла (при вступлении клеток в стадию споруляции) и при транскрипции гена с промотора *spoVG*. Однако бактерии *B. subtilis*, продуцирующие токсин Cry1, не обладали инсектицидной активностью (в качестве тест-объекта использовали личинок совки *Trichoplusia ni*) [15]. В то же время введение детерминанты *cryI* в клетки природных бактерий *B. subtilis* и *B. licheniformis* позволило наделить их инсектицидными свойствами. При этом использованная детерминанта транскрибировалась под собственным промотором [16]. В данной работе для экспрессии гена *cryIE* использовали два промотора – собственный и гибридный промотор Spac. Пред-

полагали, что данные регуляторные последовательности обеспечат транскрипцию исследуемого гена на всех стадиях роста культуры, поскольку промотор *Spac* связывается с РНК-полимеразой на протяжении всего клеточного цикла [17]. С использованием рестриктаз *AatII* и *VamHI* *Spac*-промотор вместе с геном эритромицинрезистентности вырезали из плазмиды *pMUTIN4* и встраивали в вектор между сайтами *AatII*-*VamHI* перед геном *cryIE*, содержащим собственный промотор. Полученной гибридной плазмидой трансформировали клетки *B. subtilis* 168. Отобранные плазмидосодержащие бактерии (обозначены как *B. subtilis* 168/*pALC1*) проверяли на инсектицидную активность против личинок большой вошинной моли. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали соответственно исходные бактерии *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д, а также штамм *B. subtilis* 168, содержащий исходную плазмиду *pAL1* (*B. subtilis* 168/*pAL1*), выращенные в тех же условиях. Как видно из данных, представленных в табл. 2, инсектицидная активность бактерий *B. subtilis* 168/*pALC1* не намного отличалась от таковой у исходного штамма *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д (смертность личинок составляла 80 и 90 % соответственно). Более высокая инсектицидная активность природных бактерий могла быть обусловлена их способностью синтезировать несколько токсичных соединений синергичного действия.

Т а б л и ц а 2. Биологическая активность бактерий *B. subtilis* 168/*pALC1* против личинок вошинной моли

Среда	К-во личинок вошинной моли		Биологическая активность, %
	живых	мертвых	
<i>B. thuringiensis</i> БИМ В-787 Д	2	18	90
<i>B. subtilis</i> 168/ <i>pAL1</i>	20	0	–
<i>B. subtilis</i> 168/ <i>pALC1</i>	4	16	80

Заключение. В результате проведенного исследования идентифицированы *cryI*-детерминанты природных бактерий *B. thuringiensis* БИМ В-787 Д и *B. thuringiensis* БИМ В-335 Д, продуцирующие токсины *CryIE* и *CryIA* соответственно. На основании сиквенс-анализа гена *cryIE* сконструированы праймеры, обеспечивающие амплификацию данной генетической детерминанты. Полученный ампликон содержал открытую рамку считывания и регуляторные последовательности промотора и терминатора. Показана инсектицидная активность бактерий *B. subtilis* 168, содержащих плазмиду с геном *cryIE*, транскрипция которого обеспечивалась двумя независимыми промоторными последовательностями. Полученные результаты открывают перспективы создания биопрепаратов на основе бактерий *B. subtilis*, синтезирующих соединения с антифунгальной, антибактериальной, противовирусной активностью, а при внесении *cry*-генов – дополнительно обладающих инсектицидными свойствами. При этом, в отличие от биопрепаратов на основе природных бактерий *B. thuringiensis*, полностью исключается возможность синтеза токсинов неспецифического действия. Следует отметить, что *cryI*-детерминанта встроена в плазмидный вектор, который не способен передаваться путем конъюгации в клетки других микроорганизмов (не содержит *tra*- и *mob*-детерминант) и имеет узкий круг бактериальных хозяев (наследуется только в бактериях *B. subtilis*). Созданная плазида выгодно отличается от внехромосомных генетических элементов природных бактерий *B. thuringiensis*, детерминирующих синтез *Cry*-токсинов, которые характеризуются способностью передаваться и наследоваться в клетках широкого круга грамположительных бактерий [18].

Литература

1. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. // BioTechniques. 1987. Vol. 5. P. 376–378.
2. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. 1961. Vol. 81, N 5. P. 741–746.
3. Челночный вектор для молекулярного клонирования в бактериях *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (варианты) и способ его конструирования: а. с. 7537 МПК, С12N15/63 / А. В. Лагодич, М. А. Титок; Белорус. гос. ун-т. – № А20030886. Минск, 2003. С. 1–6.
4. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D. // Microbiol. Read Engl. 1998. Vol. 144 (Pt 11). P. 3097–3104.
5. Sambrook J., Russell D. W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 756 p.
6. Te Riele H., Michel B., Ehrlich S. D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83, N 8. P. 2541–2545.

7. Reyes-Ramirez A., Ibarra J. E. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, N 3. P. 1346–1355.
8. Cerón J., Ortíz A., Quintero R. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61, N 11. P. 3826–3831.
9. Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63, N 12. P. 4883–4890.
10. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Дата доступа: 18.12.2014.
11. Reyes-Ramírez A., Ibarra J. E. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. Vol. 74, N 1. P. 125–129.
12. Liu X., Ruan L., Peng D. et al. // Toxins. 2014. Vol. 6, N 8. P. 2229–2238.
13. Bravo A., Gómez I., Porta H. et al. // Microb. Biotechnol. 2013. Vol. 6, N 1. P. 17–26.
14. Yang H., Wang P., Peng Q. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78, N 18. P. 6466–6474.
15. Crissman J. W., Causey S. C., Thorne L. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55, N 9. P. 2302–2307.
16. Theoduloz C., Vega A., Salazar M. et al. // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 94, N 3. P. 375–381.
17. Yansura D. G., Henner D. J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81, N 2. P. 439–443.
18. Hu X., Hansen B. M., Eilenberg J. et al. // FEMS Microbiol Lett. 2004. Vol. 231, N 1. P. 45–52.

I. N. ANANYEVA, I. E. RUBEL, L. N. VALENTOVICH, E. I. KOLOMIETS, M. A. TITOK

MOLECULAR GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF CRY-GENES FROM NATIVE STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Summary

The study identified *cryI*-determinants of natural bacteria *Bacillus thuringiensis* strains BIM B-787 A and BIM B-335 D, producing CryIE and CryIA toxins. *cryIE* gene with promoter and terminator sequence was amplified and cloned into a plasmid vector that is not able to be transferred by conjugation into the cells of other organisms, and has a narrow range of bacterial hosts. Shows the insecticidal activity of bacteria *B. subtilis* 168 containing the plasmid with the *cryIE* gene, transcription of which was provided by two independent promoter sequences.