

4
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL C.C.H.
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA

"ESTABLECIMIENTO DE ESTRATEGIAS PARA LA CARACTERIZACION
Y MANIPULACION GENETICA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA:

Q.F. JAIRO CERON SALAMANCA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA MOR. ABRIL DE 1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

ANTECEDENTES	PAG.
1.1. Importancia de los insecticidas Biologicos	1
1.2. Utilización de <i>B. thuringiensis</i> como Bioinsecticida	1
1.3. Clasificación de <i>B. thuringiensis</i>	3
1.4. Modo de acción de la δ -endotoxina de <i>B. thuringiensis</i>	5
1.5. Especificidad de la δ -endotoxina de <i>B. thuringiensis</i>	8
1.6. Clonación y Clasificación de Genes de la δ -endotoxina	8
1.7. Estructura del Gen .	10
1.8. Organización del Gen de la δ -endotoxina en los plásmidos	13
1.9 Expresión de los genes de δ -endotoxina	16
1.10 Metodos de transferencia de información genetica en <i>B. thuringiensis</i>	17
OBJETIVO	
MATERIALES Y METODOS	
2.1. Cepas bacterianas	21
2.2. Medios de cultivo	22
2.3. Antibioticos	22
2.4. Purificación de plásmidos de <i>B. thuringiensis</i>	22
2.5. Purificación de plásmido en <i>E. coli</i>	23
2.6. Preparación del gradiente de CsCl con Ioduro de propidio	24
2.7. Electroforesis en geles de Agarosa	24
2.8. Purificación de la δ -endotoxina de <i>B. thuringiensis</i>	25
2.9. Electroforesis en geles de acrilamida de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	26
2.10 Producción de anticuerpos en conejo	26
2.11. Transferencia de proteínas de gel de acrilamida para ensayo tipo western	27
2.12. Inmunodetección de proteínas en banda (ensayo western)	27
2.13. Mutagenesis con Nitrosoguanidina	28
2.14. Entrecruzamiento en solido	28

2.15. Transformación por formación de protoplastos en <i>B. thuringiensis</i>	29
2.16. Transformación para <i>E. coli</i> por CaCl ₂	29
2.17. Transferencia de geles de agarosa a papel de nitrocelulosa	30
2.18. Marcaje de DNA con P ³²	31
2.19. Hibridización de ADN con sonda radioactiva	31
2.20. Hibridización en colonia	32
2.21. Purificación de DNA de agarosa	32

RESULTADOS

3.1. Caracterización de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	35
3.1.1. Perfil de Plásmidos	35
3.1.2. Hibridización con el gen de <i>CryIA(b)</i>	35
3.1.3. Purificación de la toxina y producción de anticuerpos	40
3.1.4. Estructura del Cristal	49
3.2. Manipulación Genética de Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	49
3.2.1. Construcción de Cepas Receptoras	50
3.2.2. Construcción de Cepas Donadoras	50
3.3. Clonación del Gen de δ -endotoxina con un Gen de Resistencia a antibiótico	54
3.3.1. Vector de Clonación	54
3.3.2. Purificación del Gen de δ -endotoxina	56
3.3.3. Purificación de fragmentos	56
3.3.4. Transformación en <i>E. coli</i>	59
3.3.5. Patrón de Restricción del Plásmido pC1	62

DISCUSION

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

ANTECEDENTES

1.1. IMPORTANCIA DE LOS INSECTICIDAS BIOLÓGICOS

El control de plagas de insectos, en general se realiza utilizando insecticidas químicos, los cuales son de amplio espectro y tienen la capacidad de matar gran variedad de insectos. Sin embargo estos insecticidas también dañan a otros organismos como abejas, plantas y animales, incluyendo al hombre. Su uso indiscriminado ha conducido a la contaminación de suelos y agua en el planeta, ya que no son biodegradables. Además el efecto residual de estos insecticidas ha ocasionado que el organismo a controlar haya creado resistencia a dichos agentes (1). Hasta el momento, tales problemas, no han sido observados con el uso de agentes de control biológico (1).

El control de plagas por métodos biológicos es una importante alternativa para evitar los problemas antes mencionados, ya que presenta las siguientes ventajas:

- 1- alta especificidad para el insecto blanco.
- 2- ausencia de toxicidad para plantas, animales y hombre.
- 3- ausencia de contaminación en el medio ambiente.

La gran desventaja de los bioinsecticidas es que el intervalo de acción de los diferentes métodos biológicos para el control de plagas se encuentra limitado a cierto tipo de insectos.

Los microorganismos entomopatógenos utilizados para el control de plagas son diversos; hay un amplio número de virus, hongos, bacterias y protozoarios que se han empleado en la protección de bosques, cosechas y en la preservación de granos almacenados. Estos bioinsecticidas han sido producidos a gran escala (tabla 1) (2).

1.2. UTILIZACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* COMO BIOINSECTICIDA

Bacillus thuringiensis (B.t.), es una bacteria del suelo, Gram positiva, que se caracteriza por la producción de un cuerpo paraesporal durante la esporulación, el cual tiene una alta actividad biocida contra larvas de diferentes insectos.

B.t. es el microorganismo que más se utiliza como agente de control biológico. Se encuentra presente en más de un 50% de las formulaciones comerciales preparadas con mezcla de esporas y

TABLA 1
BIOINSECTICIDAS MICROBIANOS *

Organismo	Plagas Blanco	Metodo de Produccion	Produccion Comercial
BACTERIAS			
B.T.	Larvas de Lepidopteros	Fermentacion	+
B.T. sub. israelensis	Larvas de Dipteros	Fermentacion	+
B. popilliae	Escarabajo japonés	Larvas colectadas	+
B. sphaericus	Larvas de mosquito	Fermentacion	+
HONGOS			
Beauveria bassiana	Escarabajo colorado, pulga	Fermentacion	-
Hirsutella thompsonii	Acaro de citricos	Fermentacion	+
Verticillium Lecanii	Pulgon de invernadero	Fermentacion	+
VIRUS			
Sawfly NVP	Mosca de aserradero	Larvas colectadas	-
Sibeian Silkworm NPV	Dendrolimus sibiricus	Larvas colectadas	-
Cotton bullworm NPV	Heliothis spp colectadas	Larvas	+
Cabbage looper	Trichoplusia ni	Larvas colectadas	-
Cotton Leafworm NPV	Spodoptera littoralis	Larvas colectadas	-
PROTOZOARIOS			
Nosema fumiferanae	Trichoplusia ni	Larvas colectadas	-
Vairimorpha necatrix	Heliothis spp	Larvas colectadas	-

cristales. Actualmente la toxina producida por esta bacteria se ha utilizado para transformar otras bacterias como *Pseudomona fluorescens* y también para transformar plantas. Esta bacteria presenta algunas ventajas en lo relativo a costos. Los costos en el proceso de producción son muy bajos, al igual que los costos de aplicación, también tiene ventajas en cuanto a especificidad y eficacia sobre los otros organismos utilizados como bioinsecticidas. En general, el proceso de producción y purificación del producto obtenido a partir de *B.t.*, es más sencillo y de menor costo (3), comparado con microorganismos ya que los virus requieren células vivas para su desarrollo y los hongos necesitan medios complejos, lo cual hace que el costo de producción para hongos y virus sea mucho más elevado.

El cristal insecticida de *B.t.* está constituido por una proteína denominada δ -endotoxina. Estos cristales pueden estar formados por un solo tipo o por diferentes tipos de δ -endotoxina y exhiben una alta actividad insecticida de gran especificidad a diferentes insectos. A la fecha se han descrito una gran cantidad de cepas de *B.t.* con diferente espectro de acción hacia diferentes insectos (4). Se ha reportado numerosas cepas tóxicas a larvas de lepidópteros (5). También se han descrito cepas con actividad biocida contra larvas de insectos dípteros (6) y de insectos coleópteros (7).

1.3. CLASIFICACION DE *Bacillus thuringiensis*.

Varios métodos han sido usados para clasificar las cepas de *B.T.*. En 1962 De Barjac (8), clasificaron diferentes cepas de *B.t.*, de acuerdo a sus antígenos-H flagelares en 27 grupos antigenicos y 7 subgrupos, que permiten distinguir 34 sero-variedades (tabla 2) (8). Posteriormente, se incluyeron antígenos del cristal, encontrando una correlación entre el serotipo flagelar y el serotipo del cristal, con ciertas excepciones entre varias subespecies de *B.t.*. El grupo del Dr Whiteley (9) posteriormente encontraron que algunas cepas contienen dos o más tipos de δ -endotoxina en el cristal. Otra forma de clasificación es a través del uso de pruebas bioquímicas basadas en la utilización de diferentes fuentes de carbono (10). Recientemente la clasificación se realiza analizando las

TABLA 2

CLASIFICACION DE *B. thuringiensis* DE ACUERDO A SU ANTIGENO FLAGELAR

ANTIGENO H	SEROVARIETADES	REFERENCIA
1	thuringiensis	Berliner, 1915,
2	finitimus	Heimpel & Angus, 1958
3a	alesti	Heimpel & Angus, 1958
3a 3b	kurstaki	Toumanoff & Vago, 1951;
4a 4b	sotto	Heimpel & Angus, 1958
4a 4c	kenyae	de Barjac & Lemille, 1970
5a 5b	galleriae	Ishiwata, 1905; Heimpel & Angus, 1958
5a 5c	canadiensis	Bonnefoi & de Barjac, 1963;
6	entomocidus	Shvetsova, 1959; de Barjac & Bonnefoi, 1962
6a 6b	subtoxycicus	de Barjac & Bonnefoi, 1972
7	aizawai	Heimpel & Angus, 1958
8a 8b	morrisoni	Heimpel & Angus, 1958
8a 8c	ostriniaae	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8b 8d	nigeriensis	Gaixin, Ketian, et al, 1975
9	tolworthi	de Barjac, Franchon, Rajagopalan & Cosmao, Norris, 1964; de Barjac & Bonnefoi, 1968
10	darmstadiensis	Krieg, de Barjac & Bonnefoi, 1968
11a 11b	toumanoffi	Krieg, 1969
11a 11c	kyushuensis	Ohba & Aizawa, 1979
12	thompsoni	de Barjac & Thompson, 1970
13	pakistani	de Barjac, Cosmao, Shaik & Viviani, 1977
14	israelensis	de Barjac, 1978
15	dakota	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
16	indiana	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
17	tohokuensis	Ohba, Aizawa, Shimizu, 1981
18	kumamotoensis	Ohba, Ono, Aizawa, et al 1981
19	tochigiensis	Ohba, Ono, Aizawa, Iwanami 1981
20a 20b	yunnanensis	Wan-yu, Qi-fang, Xue-ping, You-wei, 1979
20a 20c	pondicheriensis	de Barjac, Franchon & Rajagopalan & Cosmao
21	colmeri	De Lucca, Palmgren, de Barjac, 1984
22	shandongiensis	Ying, Jie, Xichang, 1986
23	japonensis	Ohba, Aizawa, 1986
24	neoleonensis	Rodriguez, Galan, et al, 1988
25	coreanensis	de Barjac & Lee
26	silo	de Barjac & Lecadet
27	mexicanensis	Rodriguez y Galan, 1988

diferencias en la secuencia, estructura y organización de los genes de la δ -endotoxina, así como en su espectro de toxicidad contra los diferentes insectos. De tal manera, se han establecido 4 clases, de B.t.: las que producen proteínas CryI que ataca a larvas de insectos lepidópteros, CryII que ataca a larvas de lepidópteros y dípteros, CryIII que ataca a larvas de insectos coleópteros y CryIV que ataca a larvas de dípteros (11).

Dentro de estas clases se han reportado diferentes subclases, en base a diferencias en la secuencia nucleotídica del gen de la δ -endotoxina, de tal manera que dentro de las proteínas CryI, se han descrito 6 subclases, cada una de las cuales presenta actividad biocida hacia diferentes tipos de insectos lepidópteros (tabla 3) (11).

1.4. MODO DE ACCION DE δ -ENDOTOXINA DE *B. thuringiensis*.

La toxina de este microorganismo se sintetiza durante la esporulación. El peso molecular aproximado de esta proteína es de 130 a 140 KDa y se le denomina protoxina. La protoxina es digerida en el intestino medio del insecto por las condiciones alcalinas y proteasas presentes, liberándose un péptido tóxico de menor tamaño, aproximadamente de 60 a 70 KDa. Estudios histológicos *in vivo*, con larvas de lepidópteros alimentadas con diferentes toxinas han demostrado que la toxina afecta las células del epitelio del intestino medio de la larva (12).

Los cambios histopatológicos descritos incluyen: hipertrofia de las células del epitelio intestinal, desintegración de las microvelocidades, alteración en los organelos citoplásmicos y del núcleo, vacuolización del citoplasma y finalmente lisis celular.

Experimentos realizados con toxinas activadas *in vitro*, mediante tratamientos con enzimas proteolíticas han demostrado también que la toxina causa citólisis en ciertas líneas celulares de insectos lepidópteros y de células del intestino medio de larvas (12). Actualmente el mecanismo de acción de la toxina más aceptado es el propuesto por el Dr. Ellar (12a) con la hipótesis de la osmosis coloidal. El mecanismo propuesto es un proceso en dos etapas en el cual la toxina primero reconoce y se une a un receptor de superficie y segundo, induce la formación de poros en la membrana.

TABLA 3'

CLASIFICACION DE GENES DE PROTEINA DEL CRISTAL INSECTICIDA DE <i>B.thuringiensis</i>			
GEN	RANGO DE HOSPEDERO	NUM. DE AMINOAC.	PESO MOLECULAR (KDa)
<i>CryIA(a)</i>	L	1176	133.2
<i>CryIA(b)</i>	L	1155	131.0
<i>CryIA(c)</i>	L	1178	133.3
<i>CryIB</i>	L	1207	138.0
<i>CryIC</i>	L	1189	134.8
<i>CryID</i>	L	1165	132.5
<i>CryIIA</i>	L/D	633	70.9
<i>CryIIB</i>	L	633	70.8
<i>CryIIIA</i>	C	644	73.1
<i>CryIVA</i>	D	1180	134.4
<i>CryIVB</i>	D	1136	127.8
<i>CryIVC</i>	D	675	77.8
<i>CryIVD</i>	D	643	72.4

Rango de hospedero:

L: Lepidópteros, D: Dípteros, C: Coleopteros.

• Tomado de Hofte y Whiteley, 1989 (11).

Tal alteración resulta en un flujo bidireccional de iones acompañado por una entrada de agua; dando como resultado que las células del intestino de la larva se inflamen y terminen lisándose. El sitio de acción es la membrana epitelial del intestino medio, donde la δ -endotoxina se une a receptores específicos. La presencia de receptores ha sido demostrada por experimentos de competencia con δ -endotoxina marcada con Iodo radiactivo. Diferentes δ -endotoxinas parecen reconocer diferentes receptores; sin embargo, poco se conoce aun sobre la naturaleza bioquímica de este receptor (11,15).

En cuanto al efecto de la toxina en la membrana, existen varias teorías; en experimentos realizados por Wolfersberger y colaboradores (16), usando vesículas formadas de microvellosidades aisladas del epitelio intestinal de *Trichoplusia ni*, indican que la toxina activada de *B. t.* altera la permeabilidad del potasio. Proponen la existencia de una interacción entre la toxina con el receptor para alterar los canales para iones potasio. Por otro lado experimentos realizados con vesículas formadas con las microvellosidades del epitelio de *Manduca sexta*, han demostrado que la entrada de ciertos aminoácidos al intestino medio es dependiente de un gradiente de potasio y que este es inhibido por la δ -endotoxina. La δ -endotoxina altera la permeabilidad de sodio y potasio en estas vesículas, pero se han encontrado que toxinas casi idénticas solamente alteran la permeabilidad del potasio. Los iones sodio requieren poros más grandes que los iones potasio, Wolfersberger sugiere que el tamaño de los poros inducidos por la δ -endotoxina pueden variar, siendo algunos poros más selectivos que otros (17).

Recientemente se ha reportado que el efecto de la toxina puede ser bloqueado si se tratan las membranas con el inhibidor de canales de sodio (tetrodoxina) y potencializado si se tratan las membranas con el inhibidor de canales de potasio (4-aminopiridina) (12b).

También en *Manduca sexta* se ha reportado que la δ -endotoxina es capaz de inhibir el transporte activo de potasio en el intestino medio de las larvas, postulando que esta toxina afecta la permeabilidad de el epitelio (13). Por último conviene mencionar que en 1990 Slatin y et.al (14) reportaron que dos diferentes δ -endotoxinas CryI(A) y CryIII A, forman canales iónicos selectivos en bicapas lipídicas planares. Los canales formados por

ambas toxinas son altamente selectivos a cationes. La habilidad de estas proteínas de formar tales canales puede explicar su acción toxica sobre células sensibles y sugiere que esta familia de toxinas pudieran actuar por mecanismos comunes.

1.5. ESPECIFICIDAD DE LA δ -ENDOTOXINA DE *B.T.*

La variación en el rango de acción de una δ -endotoxina específica puede estar influenciada por diferentes mecanismos. Se ha descrito que la larva puede afectar la solubilización y/o el procesamiento proteolítico de la protoxina a toxina (15).

Recientemente diferentes grupos de investigación, se han enfocado al estudio del modo de acción de la toxina de *B.t.*. Experimentos realizados con toxinas marcadas con I^{125} y vesículas formadas de las microvellosidades aisladas del epitelio intestinal, han demostrado la existencia de un receptor específico para cada toxina, presente solamente en las membranas de insectos susceptibles. De estos estudios se ha establecido una correlación directa entre la unión de la toxina al receptor en la membrana y la toxicidad ; de tal manera que la presencia o ausencia de estos receptores determina la especificidad de cierta toxina (15).

1.6. CLONACION Y CLASIFICACION DE GENES DE δ -ENDOTOXINA

Las investigaciones a nivel molecular se han enfocado en 3 áreas de estudio: localizar el gen que codifica para la δ -endotoxina; determinar la secuencia de bases de este gen y estudios sobre los mecanismos que controlan su expresión.

En cuanto a la localización del gen , se ha reportado que cepas que producen normalmente la δ -endotoxina pueden perder la capacidad de formar el cristal y por lo tanto también la actividad insecticida; la reversión de estos eventos ocurre pocas veces. La pérdida irreversible de la síntesis del cristal parece estar relacionada con la ausencia o pérdida de plásmidos (18). Experimentos donde inducen la pérdida de plásmidos por tratamientos con naranja de acridina y calor (19,20), demostraron que cuando una cepa de *B.t.* pierde ciertos plásmidos, pierde también la capacidad de síntesis del cristal, lo cual llevó a la conclusión de que la toxina está codificada en un plásmido.

En 1983, el grupo del Dr. Kronstad (21), utilizó un fragmento de 732 pares de bases de una clona que codifica para la δ -endotoxina, como sonda radiactiva en experimentos de hibridización en banda. Cuando ensayaron los plásmidos de 22 cepas de *B.t.*, representando 14 subespecies, encontraron que la sonda hibridizó con un plásmido en 8 cepas, con más de 1 plásmido en otras 7 cepas; en 2 de ellas la resolución fue insuficiente para diferenciar entre 1 o 2 plásmidos. El intervalo de tamaño de los plásmidos hibridizados oscila entre 33 y 150 MDal. En una subespecie, *wuhanensis*, no hubo hibridización en plásmidos, pero se observó una fuerte señal de hibridización en el ADN total, indicando que el gen puede también estar localizado en el cromosoma. Posteriormente se ha reportado que los genes presentes en el cromosoma de *B.t.* no se expresan (22). Para otras 4 subespecies, reportadas como no tóxicas a lepidópteros no hubo señal de hibridización en plásmidos ni en el ADN total. La hibridización de plásmidos y ADN total de varias subespecies *thuringiensis* y *kurstaki* reveló que la homología del gen clonado estaba asociada a un plásmido y que varias de estas cepas contienen múltiples regiones de homología, implicando la presencia de varios genes de δ -endotoxina (23).

La clonación del gen que codifica la δ -endotoxina, fue realizado por primera vez por el grupo de Schnepf y Whiteley en 1981 (24). Posteriormente otros grupos de investigadores han clonado genes de δ -endotoxina de varias subespecies de *B.t.*. A su vez han sido utilizadas estas clonas como sondas para localizar genes que codifican para δ -endotoxina en otras subespecies.

Hasta 1989 habían sido reportadas 42 secuencias nucleotídicas de genes que producen la proteína del cristal (11). Muchas de estas secuencias son idénticas o muy semejantes, representando al mismo gen. Tomando esto en cuenta, Hoftman y Whiteley (11), sugiere que que existen 13 genes diferentes que codifican para la familia de proteínas Cry. Como se mencionó anteriormente estos 13 genes han sido divididos en 4 clases y varias subclases, caracterizadas tanto por sus similitudes estructurales como por el espectro de actividad insecticida de la proteína codificada (*cryI*, *cryII*, *cryIII* y *cryIV*) (tabla 3) (11). Las proteínas *cryI* específicas contra insectos lepidópteros son las más estudiadas. Se han reportado 20 secuencias de genes *CryI*, de los cuales se pueden distinguir 6 diferentes subclases, como se observa en la Tabla 3 (11). Los 20 genes

TABLA 4^{*}
 PORCENTAJE DE HOMOLOGIA DE AMINOACIDOS ENTRE PROTEINAS DE
 DE LOS GENES *Cry*

% de homología de aminoácidos para:

Proteínas	cristal	<i>CryIA</i> (b)	<i>CryIA</i> (c)	<i>CryIB</i>	<i>CryIC</i>	<i>CryID</i>	<i>CryIIIA</i>	<i>CryIVA</i>	<i>CryIVB</i>	<i>CryIVC</i>
<i>CryIA</i> (a)	90		82	55	67	71	25	27	27	22
<i>CryIA</i> (b)		86		56	66	71	28	27	27	23
<i>CryIA</i> (c)			55		67	70	23	28	24	24
<i>CryIB</i>				58		56	34	26	28	22
<i>CryIC</i>					70		31	26	30	21
<i>CryID</i>						23		28	28	22
<i>CryIIIA</i>							23		19	26
<i>CryIVA</i>								54		29
<i>CryIVB</i>										29

* Tomado de Hofte y Whiteley, 1989 (11)

TABLA 5
TOXICIDAD DE LAS PROTEINAS DEL CRISTAL CONTRA CINCO ESPECIES DE
Lepidopteros *

		LC ₅₀ de proteínas para:				
Proteína	Subespecie y cepa	<i>P.b</i>	<i>M.s.</i>	<i>H.v.</i>	<i>M.b.</i>	<i>S.l.</i>
<i>Cry</i>	de <i>B.thuringiensis</i>	(ng/ml)	(ng/cm ²)	(ng/cm ²)	(ng/cm ²)	(ng/cm ²)
<i>CryIA(a)</i>	aizawai HD-68	800	5.2	90	165	>1350
<i>CryIA(b)</i>	berliner 1715	700	8.6	10	162	>1350
<i>CryIA(c)</i>	Kurstaki HD-73	300	5.3	1.6	2000	>1350
<i>CryIB</i>	<i>thuringiensis</i> 4412	2800	>625	>625	>1350	>1350
<i>CryIC</i>	<i>entomocidus</i> HD-110	6000	>128	>256	22	104
<i>CryID</i>	aizawai HD-68	>7500	5	>256	>1350	>1350

P. b.: *Pieris brassicae*, *M. s.*: *Manduca sexta*, *S. l.*: *Spodoptera littor.*

H. v.: *Heliothis virescens*, *M. b.*: *Mamestra brassicae*

LC₅₀ : Concentración necesaria para matar a la mitad de la población

* Tomado de Hofte y Whiteley, 1989 (11).

altamente conservada presentando homologías hasta de un 90%. Posteriormente Sanchis (26), encontró que en todos los genes de δ -endotoxina, (*cryI*, *cryII*, *cryIII* y *cryIV*), existen 5 regiones en el fragmento tóxico altamente conservadas. Por lo que se ha propuesto que todos los genes tienen el mismo modo de acción, fig 2 (26).

1.8. ORGANIZACION DEL PLASMIDO QUE CONTIENE EL GEN QUE CODIFICA PARA LA TOXINA

El número de plásmidos por cepa puede ser de hasta 12, en un intervalo de tamaño de 1.4 a 150 MDa. Los plásmidos que lleva cada serotipo de *B.t.* son únicos y pueden ser distinguidos de otro serotipo (27). En la mayoría de los serotipos de *B. t.* los elementos extracromosomales son crípticos; únicamente se sabe que algunos están involucrados en la síntesis de la δ -endotoxina (28). En 1983, el grupo del Dr. Lereclus (29), transfirió el plásmido PAM81, proveniente del *Streptococcus faecalis* a *B. t.*. Este plásmido posee un marcador de resistencia a Eritromicina y tiene un peso molecular de 20 MDa.; posteriormente al extraerlo de *B.t.* y purificarlo encontraron que tenía un inserto de 3 MDa de ADN proveniente de un plásmido de *B. t.*; usando este nuevo plásmido como sonda en experimentos de hibridación observaron que presentaba homología con otros plásmidos de varias subespecies de *B. t.*. Posteriormente, este mismo grupo demostró que este inserto de 3 MDa., contenía un transposon, que presenta la secuencia para una transposasa, así como elementos invertidos repetidos denominados IRL (1.3 MDa) a los 2 extremos del gen transposasa. Este transposon presenta una organización compleja, ya que encontraron un segundo elemento repetido flanqueando los extremos del gen transposasa, denominado IR2 (1.6 MDa) (30,31) (fig.3) (30).

La secuencia de 3 MDa. es referida ahora como transposon Tn4430 y es el primer transposon aislado del género *Bacillus*; este segmento de ADN es similar a los transposones del grupo Tn3 (32). Lo más importante respecto a este transposon Tn4430, es que está directamente relacionado con el gen de la δ -endotoxina (33).

En 1987, Mahillon et al (34), secuenciaron otros 2 elementos de inserción flanqueando el gen de la toxina en la subespecie *berliner* 1715, encontrando 2 variantes de IRL. Al secuenciarlos se observó

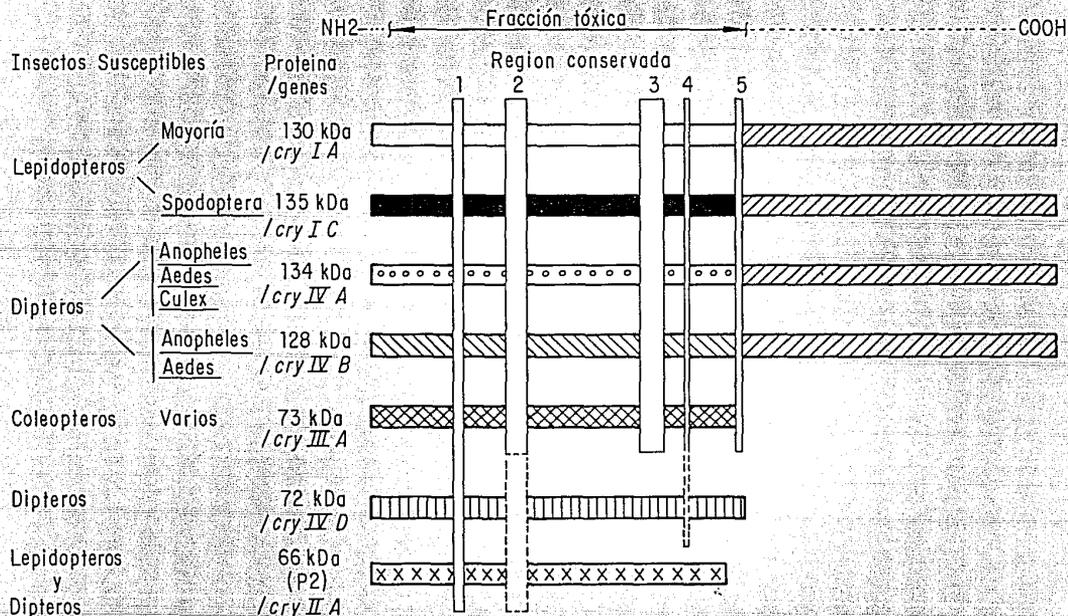


Fig 2 Las 5 regiones representadas por cuadros verticales son regiones altamente conservadas entre las diferentes proteínas Cry.
 Los cuadros puntuados corresponden a una menor homología

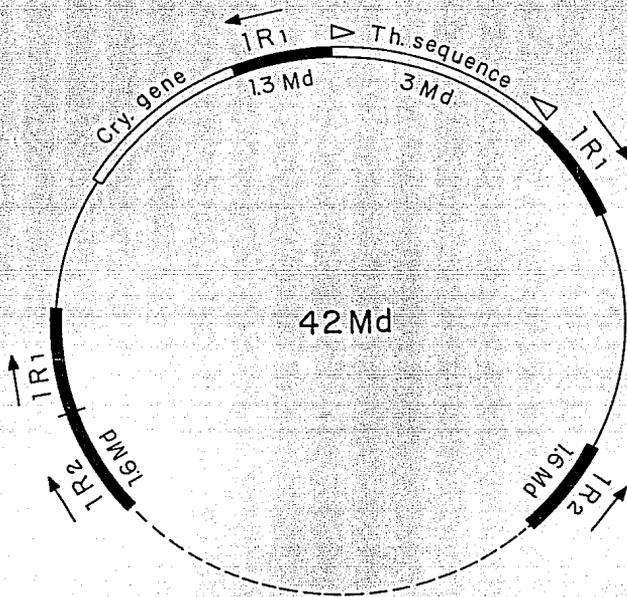


Fig 3 Organización del gen de la toxina. IR1, IR2 son secuencias invertidas repetidas. secuencia th: secuencia gene transposasa

una asociación estructural entre estos elementos y el gen de la toxina ya que también flanquean el gen de la δ -endotoxina. En 1986 se demostró que el transposon Tn4430 puede transponer en *E. coli* (32). La evidencia de la transposición del Tn4430 a otros plásmidos y el arreglo de los elementos repetidos flanqueando el gen de la toxina, sugieren que el gen de la δ -endotoxina podría estar también sujeto a transposición, lo cual explicaría aún más la amplia distribución de genes de la δ -endotoxina entre los diferentes plásmidos de las cepas de *B.t.*.

1.9. EXPRESION DE LOS GENES DE δ -ENDOTOXINA

Diversos estudios han demostrado la presencia de varios puntos de regulación en la expresión de diferentes genes de δ -endotoxina. El gen *CryIA(a)* se transcribe a partir de 2 promotores separados entre sí por 16 pares de bases, el promotor BtI es activado en un estado temprano de esporulación, mientras que el promotor BtII, es activado en la mitad de la fase de esporulación (35).

La transcripción "in vitro" a partir de BtI es catalizada por una RNA polimerasa específica de la etapa de esporulación que contiene una nueva subunidad sigma (σ) de 35 KDa (36); en cambio los genes vegetativos son transcritos por otra RNA polimerasa presente sólo en la etapa vegetativa, la cual contiene una subunidad sigma de 61 KDa. La transcripción de BtII requiere de la RNA polimerasa de la etapa de esporulación con una nueva subunidad sigma de 28 KDa. Los promotores BtI y BtII no muestran homología con las secuencias consenso reconocidas para la RNA polimerasa vegetativa. Para los genes *CryIA(b)* y *CryIA(c)* se ha reportado que poseen la misma estructura del promotor que *CryIA* (27); y la transcripción de otros genes *CryIB*, *CryIIA*, requieren de la RNA polimerasa con la sigma 35. Los genes *cryIII* y *cryIV* también requieren de la RNA polimerasa con la sigma 35, es decir tienen la misma organización génica.

Por otro lado se ha descrito la presencia de un terminador el cual incrementa la estabilidad del mRNA. Esta estabilidad a su vez es parcialmente responsable por la producción abundante de las protoxinas del cristal durante la esporulación (38).

1.10. METODOS DE TRANSFERENCIA DE INFORMACION GENETICA EN *B. thuringiensis*

Los métodos que se han utilizado para transferencia de información genética entre cepas de *B.t.*, son la conjugación, la transformación y la transducción. Un sistema que involucra el contacto célula-célula fue descrito en 1982 por Gonzales y colaboradores (39). Descubrieron que algunos plásmidos de *B. t.* podrían ser transferidos por conjugación a cepas de *B. cereus* durante el crecimiento en cultivos mixtos, demostrando además que algunos de estos plásmidos transmisibles portan el gen estructural de la δ -endotoxina. Las cepas de *B. cereus* utilizadas, son bacterias Gram positivas capaces de esporular, pero no produce la δ -endotoxina. En cambio las cepas transconjugantes de *B. cereus* obtenidas codifican para una δ -endotoxina con la misma antigenicidad que la producida por la cepa donadora. Posteriormente, Rapoport y colaboradores en 1983 (40), realizaron experimentos de conjugación en donde utilizaron como cepa donadora un *B. subtilis* que posee el gen de δ -endotoxina *cryIA(b)*, clonado de la subespecie berliner 1715, y como receptora una cepa mutante de *B. t.* subesp. *kurstaki* que no produce δ -endotoxina y también una segunda cepa receptora de *B.t.* subesp. *israelensis*, la cual presenta una δ -endotoxina activa contra larvas de dípteros, perteneciente al grupo *cryIV*. Al realizar las cruces se obtuvo una transconjugante de la subesp. *kurstaki* que producía el cristal y presentaba actividad tóxica a larvas de lepidópteros característica de genes *cryIA(b)*; y también transconjugantes de la subespecie *israelensis* la cual producía ambos tipos de δ -endotoxina (*cryIA(b)* y *cryIV*), que son activas contra larvas de dípteros y de lepidópteros.

La transferencia de información genética por conjugación entre cepas de *B.t.* y otras especies de bacterias o entre cepas de *B. t.*, aporta una interesante posibilidad de ampliar la especificidad al introducir varios genes de δ -endotoxina de diferentes orígenes en una misma cepa receptora. La transducción es la transferencia genética entre bacterias mediada por fagos, varios fagos han sido aislados y usados para estudios preliminares de mapeo en cepas de *B.T.* como los fagos TP13 y TP18 (27).

La transferencia de información genética por procesos de

transformación depende de la habilidad de la célula receptora de captar ADN del medio, el procedimiento usado es por formación de protoplastos. Los protoplastos de *B.t.* pueden ser transformados con plásmidos en presencia de polietilenglicol, se han transformado cepas de *B.T.* subespecie HD1 y *B. cereus* con el plásmido pBC16 y pC194 (41,42). Otro procedimiento de transformación de cepas de *B.T.* es por electroporación(43), en el cual no se involucra formación previa de protoplastos, esta basado en una aplicación de voltaje a una solución de 10^9 células y el plásmido respectivo, la eficiencia de transformación es más alta por electroporación que por fusión de protoplastos(43).

OBJETIVO

sistema que nos permita caracterizar a cepas de *B.t.*, identificar cuantas proteínas de δ -endotoxina tienen, cuantos genes y si estos tienen acción sobre lepidópteros o coleópteros, así como su toxicidad contra diferentes insectos.

En este trabajo se tiene como objetivo establecer un sistema de caracterización de cepas de *B.t.*, el cual nos permita definir los puntos anteriores:

- 1- Número de proteínas asociadas al cristal,
- 2- Numero de genes de δ -endotoxina
- 3- Identificar proteínas específicas contra lepidópteros o coleópteros.

Para la realización de este trabajo contamos con 8 cepas de *B. t.*, las cuales las hemos obtenido de diferentes fuentes, y de las cuales no se conoce ninguno de los datos anteriormente señalados. Contamos con una excepción que es la cepa HD-1, la cual es la cepa tipo. Esta posee 3 genes de δ -endotoxina *cryIA(a)*, *cry IA(b)* y *cryII(A,B)* y ha sido ampliamente caracterizado por otros grupos (45). Esta cepa se utiliza como bioinsecticida comercialmente en los E.U.A (producto Dipel) (2).

Para definir el número de proteínas asociadas al cristal insecticida, se purificarán los cristales de las diferentes cepas a partir de cultivos esporulados. Se identificarán las proteínas específicas contra lepidópteros o contra coleópteros mediante inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra *cry IA(b)* y *cry IIIA*. El número de plásmidos que portan el gen de la δ -endotoxina se visualizará mediante hibridaciones tipo southern de ADN de plásmido utilizando como sonda el gen *cry IA(b)*. En este análisis no podremos distinguir los plásmidos que codifican para genes específicos contra coleópteros, ya que no contamos con un gen *cryIIIA* para ser utilizado como sonda en nuestro análisis. La toxicidad de estas cepas contra diferentes insectos lepidópteros será evaluada por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Nuevo León.

Dada las características de restringida especificidad de las toxinas de *B.t.*, sería muy interesante poder manipular las cepas de *B.t.* a fin de producir una cepa de *B.t.* con un espectro más amplio en su acción insecticida. Es por esto que este trabajo presenta

como segundo objetivo el establecimiento de una estrategia para facilitar la construcción de una cepa de *B.t.* que exprese varios genes de δ -endotoxina de diferentes orígenes.

Para la realización de este objetivo escogimos el método de conjugación como sistema de transferencia de información genética y proponemos varios métodos para marcar el plásmido que lleva la información para δ -endotoxina a fin de poder identificar las cepas transconjugantes y de mantener estable la expresión de 2 o más toxinas en una sola cepa.

MATERIALES Y METODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo utilizamos 8 diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (B.t.), estas fueron obtenidas de diferentes fuentes (tabla 6). Estas cepas son resistentes naturales a ampicilina en una concentración de antibiótico de 30 ug/ml. También utilizamos algunas cepas de *E. coli* (tabla 6), así como *Streptococcus faecalis* y de *Bacillus subtilis* (tabla 6)

Tabla 6
Cepas Bacterianas

Nombre de la Cepa	Especie Bacteriana	Fuente	Característica
B40	<i>B.t.thuringiensis</i>	Cinvestav del I.P.N.	Amp ^R
B43	<i>B.t. Sotto</i>	Cinvestav del I.P.N.	Amp ^R
HD25	<i>B.t.</i>	CIFICE, UNAM	Amp ^R
HD27	<i>B.t.</i>	CIFICE, UNAM	Amp ^R
HD1	<i>B.t. kurstaki</i>	U.A. de Nvo. Leon	Amp ^R
GM2		U.A. de Nvo. Leon	Amp ^R
GM7	<i>B.t. Aizawai</i>	U.A. de Nvo. Leon	Amp ^R
GM10	<i>B.t. Aizawai</i>	U.A. de Nvo. Leon	Amp ^R
HB101	<i>E.coli</i>	CEINGEBI UNAM	
HB101pBt200	<i>E.coli</i>	Cinvestav del I.P.N.	Codifica gen cry IA(b) Amp ^R
ECBS42	<i>E.coli</i>	Genencor Inc. USA	Vector con doble origen de replicación Km ^R , Clm ^R
CG 110	<i>S. faecalis</i>	Univ. of Michigan USA	pBC16 contiene Tn916
	<i>Bacillus subtilis</i>	CEINGEBI UNAM	Cepa receptora en experimento de conjugación

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Para el crecimiento de *B.t.*, *E. coli*, *S. faecalis* y *B. subtilis*, se utilizó Caldo Luria: Bacto-Triptona 1.0%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl.1.0%, pH 7.3.

Para mantenimiento de las cepas se usó caldo Luria solido, el cual contiene: agar al 2.0% con el antibiótico respectivo.

Para inducir la producción de la protoxina, en las cepas de *B.t.*, se utilizó el medio HCO (46), que contiene: Bacto-peptona 7.0 gr/lit., KH_2PO_4 0.05M, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $4.8 \times 10^{-4}\text{M}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1.3 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $4.8 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $7.1 \times 10^{-5}\text{M}$, CaCl_2 anh. $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$, pH 7.2 y glucosa $1.66 \times 10^{-2}\text{M}$.

El medio mínimo (47), para crecimiento de *B.T.* es el siguiente:

$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 2.0 gr, Tiamina 0.01 gr, KH_2PO_4 6.0 gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 gr, K_2HPO_4 14.0 gr, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04 gr, Citrato de sodio 1.0 gr, MnSO_4 0.25 m, L-glutamico 2.0 gr, Glucosa 50.0 gr, Glicina 0.20 gr, Casaaminoacidos 5.0 gr, ajustar a pH 7.0 con NaOH, completar con H_2O destilada a 1 litro. La glucosa y casaaminoacidos se deben esterilizar por separado y adicionarse en frio en condiciones esteriles.

2.3. ANTIBIOTICOS

Las concentraciones finales de los antibióticos que se utilizaron son las siguientes: Eritromicina 1ug/ml, Cloramfenicol 5ug/ml, Tetraciclina 4ug/ml, Ampicilina 30ug/ml, Estreptomicina 200ug/ml, Rifampicina 30ug/ml.

2.4. PURIFICACION DE PLASMIDOS DE *B. thuringiensis*

Los plásmidos se purificaron siguiendo el protocolo descrito por Kronstad y et.al (48).

Se crecen las células en 50 ml medio líquido Luria a una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. Se recuperan las células por centrifugación a 7500 rpm. por 15 minutos. Se resuspenden en 0.5 ml de buffer TE (tris 50mM + EDTA 20mM. pH 8.0). Se adicionan 9.5 ml de solución: TE + 10% de SDS. + 0.085M de NaOH; pH final 12.4. Se incuban 30 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional suave. Se adicionan: 1.0 ml de SDS al 10% y se mezcla suavemente. Se agrega: 1.0 ml de Tris 2M pH 7.0 y 3.0 ml de NaCl 5M; se debe

mantener toda la noche a 4°C. Se centrifuga a 11000 rpm por 15 min. Se adiciona al sobrenadante, 3.6 ml de polietilenglicol al 50%(p/v) y se mantiene en hielo por lo menos durante 3 horas. Se centrifuga a 10000 rpm. por 15 min. Se descarta el sobrenadante. Se invierten los tubos, y se dejan secar los plásmidos y se resuspende en 0.4 ml de TE (Tris 10mM + EDTA 1mM, pH 8.0). Guardar a 4°C.

2.5. PURIFICACION DE PLASMIDO DE *E. coli*

Para la purificación de plásmidos en *E. coli*, se incuban las células durante la noche en 10 ml de caldo Luria con el respectivo antibiótico. Se inoculan en 500 ml de LB con 5 ml del crecimiento anterior, se adiciona el respectivo antibiótico, se incuba a 37°C a 200 rpm, hasta una densidad óptica de 0.8-1.0 a 600 nm y se adicionan 90-100 mg de Cloramfenicol o Espectinomicina (si la cepa es resistente al Cloramfenicol), y se deja incubando por 16 hrs. Se centrifuga a 7000 rpm, 10 min., 4°C. Se resuspenden las células en un total de 10 ml/litro de cultivo, de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 y se deja en hielo en hielo.

Añadir 3 ml de EDTA 0.25M pH 8.0, 10 mg de lisozima, 0.1 ml de RNAasa (10mg/ml), se mezcla suavemente y se deja en hielo 15 min. Se añaden 3 ml de mezcla lítica de Tritón 3X (3 ml de triton X-100 al 10%, 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCL 1 M pH 8.0, 7 ml de H₂O), se mezcla suavemente y coloca en hielo 15 min. Se centrifuga a 18000 rpm por 40 min. Se decanta el sobrenadante en una probeta graduada de plástico, anotando el volumen, se vacía a botellas de 250 ml, se adiciona un volumen igual de agua destilada. Se añade un volumen de fenol saturado frío (fenol saturado con amortiguador: una mezcla 1:1 de fenol destilado sobre zinc, y Tris-HC 150mM, NaCl 100 mM, pH 7.5; se equilibra toda la noche con agitación). Se mezcla suavemente y se añade un volumen de cloroformo igual al de fenol, se mezcla. Se centrifuga a 6500 rpm, 10 min, 4°C. Se coloca la fase superior en otra botella de 250 ml. Se añaden 0.2 volumen de NaCl 5M y 0.33 volúmenes de polietilenglicol 6000 al 30%. Se mezcla, debe dejarse a 0°C durante toda la noche. Se centrifuga a 9000 rpm por 20 min, se resuspende en buffer TNE (20 mM Tris-HCL pH 7.8, 1M NaCl, 1mM EDTA) y se precipita con etanol a -20°C. Se deja a -20°C una hora o más. Se centrifuga a 12000 rpm por 12 min a 4°C. Posteriormente se debe purificar por gradiente de CsCl.

2.6. PREPARACION DEL GRADIENTE DE CsCl-CON YODURO DE PROPIDIO (IPd)

A 2.1 ml de H₂O conteniendo aproximadamente 500 ug DNA adicionar 2.15 gr de CsCl y disolver.

A partir de este punto, todo trabajo debe hacerse en la oscuridad ya que el IPd es sensible a la luz visible.

Adicionar 150 ul de una solución de 2 mg/ml de yoduro de propidio. Cubrir con 2.3 ml de aceite mineral. Se balancean los tubos, dentro de las camisas, con aceite mineral. Centrifugar con rotor SW50.1 (Beckman) a 38000 rpm, por 20-22 horas a 20°C. El DNA en el gradiente será visible con luz ultravioleta ya que el IPd es fluorescente. Se observarán dos bandas: la superior, formada por DNA bacteriano y plásmido roto; y la inferior, por el plásmido. En la oscuridad y bajo luz UV, picar el fondo de los tubos y coleccionar, lentamente el DNA de plásmido en un tubo eppendorff. Para eliminar el IPd se utiliza una columna de intercambio iónico: Dowex 50W-X8, Bio-rad; tratada con ácido y luego con base, 1N respectivamente, neutralizada y almacenada en Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.5M, pH 8.0. Para eliminar el IPd, se colocan 2.0 ml de resina en una pequeña columna, y se equilibran con 10 ml de amortiguador de resina Dowex: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 1M, EDTA 1mM, por cada ml de resina. En la oscuridad, se coloca la muestra diluida 1:1 con amortiguador Dowex; si no se hace la dilución del CsCl, el complejo DNA-IPd se mueve demasiado rápido a través de la columna, eluir lentamente y añadir, por lo menos, un volumen de columna de amortiguador Dowex para lavar el DNA remanente. Revisar con luz UV si todo el IPd se ha eliminado; si algo salió, correr el eluato a través de una segunda columna. Dializar el DNA contra 2 litros de Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM, pH 8.0 por 6-8 horas a 4°C. Repetir la operación una o dos veces más. Sacar el DNA de la bolsa de diálisis, y precipitar añadiendo: 1/25 del volumen de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol a -20°C. Dejar a -20°C por una hora o más. Centrifugar en rotor JA-20 (Beckman), a 4°C, 60 min, a 6500 r.p.m.

Resuspender en 0.5-1 ml de buffer TE 10mM/1mM. Medir la densidad óptica a 260 nm para determinar la concentración de DNA, con 5 ul de solución del paso anterior en 995 ul de H₂O destilada, el blanco con 1 ml de H₂O, una unidad de absorbancia equivale a 50 ug de DNA.

2.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis (50), se llevó a cabo, utilizando Agarosa (Bio-Rad), al 0.7% y 1.0%; la agarosa se disolvió mediante ebullición en buffer Tris-Boratos-EDTA, (Trizma base (sigma) 90mM, H_3B_3 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.2), posteriormente se vació en la cámara de electroforesis y se dejó gelificando. Las muestras, con un contenido de 0.2-1.0 ugr de DNA, se colocaron en los carriles. La electroforesis se llevo a cabo a 70 volts, a temperatura ambiente durante dos horas. Terminada la electroforesis, los geles se sumergen en una solución de bromuro de etidio (4mg/ml) y se iluminan con una lampara UV de onda corta. Para las fotografias de los geles se usó película kodak, cámara polaroid y filtros de gelatina rojo y amarillo.

2.8. PURIFICACION DE LA δ -ENDOTOXINA DE *B. thuringiensis*

La purificación del cristal de *B.t.* se llevó a cabo según lo reportado por W.E. Thomas, y D.J. Ellar (51).

Las cepas se crecen en 1 litro de medio HCO hasta tener completa esporulación. Recuperar las esporas y cristales centrifugando a 7500 rpm por 15 min a 4°C. Sonicar la muestra 4 pulsos por 30 seg. Centrifugar a 7,500 rpm por 15 min. Los restos celulares se remueven lavando el pellet con agua destilada, esteril, fria a 4°C. Este paso se repite 4-5 veces, hasta que las esporas y cristales esten libres de restos celulares cuando se observan en microscopia de contraste de fases. El pellet final se resuspende en buffer pH 7.5. Las esporas y cristales se separan utilizando centrifugación diferencial a traves de un gradiente discontinuo de sacarosa: La mezcla de cristales y esporas (50mg) se coloca sobre un gradiente de 30 ml, formado por 10 ml de sacarosa 87% p/v en 50 mM de Tris, 10mM de KCl pH 7.5, 10 ml de sacarosa 67% p/v en el mismo buffer y 10 ml de sacarosa 45% p/v en el mismo buffer. Centrifugar en ultracentrifuga con rotor SW 28 a 21000 rpm, por 14 horas a 4°C. El cristal formara una banda en la interfase de 67% a 87% y las esporas formaran un pellet en el fondo del tubo. La interfase 87%-67% que contiene el cristal es recolectado por succion con bomba peristaltica a velocidad de 20 ml/hr. Las fracciones que contienen los cristales de cada cepa son lavados con

H₂O destilada esteril fría 4 o 5 veces para remover la sacarosa residual. El pellet final se resuspende en el menor volumen de H₂O para liofilizarlo. Pesar 0.1 mg de cristal y resuspender en H₂O. Realizar coloración simple del cristal y observar al microscopio. Determinar proteína por el método de Lowry.

2.9. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida al 7% (52), se prepararon mezclando acrilamida-bisacrilamida al 30% 2.33 ml, buffer Tris-HCL 1.5 M pH 8.0, 2.5 ml, SDS 10% 0.1 ml, H₂O 5.01 ml. Persulfato de Amonio 10% 50 ul y posteriormente 5 ul de Temed. Se vació sobre el molde. La electroforesis en estos geles se lleva a cabo a 20 mAmp., en buffer Tris-base 0.0248 M, Glicina 0.191 M, SDS 0.0034 M, durante 3 hrs. Las muestras con un contenido de 1.0 ug a 200 ug de proteína, se colocan en los carriles. Terminada la electroforesis el gel se tiñe con una solución que contiene 50 ml de metanol, 30 ml de ácido acético y 20 ml de H₂O y 0.1% de azul de coomassie, se deja en esta solución aproximadamente 8 hrs., luego se coloca el gel para desteñir en la misma solución anterior pero esta vez sin el azul de coomassie durante 2 h, finalmente el gel se coloca en una solución de ácido acético al 10% durante 1 hr, se coloca el gel en H₂O destilada y luego de rehidratado se toma la foto.

2.10. PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN CONEJO

Para la producción de anticuerpos en conejo se corre un gel de poliacrilamida al 7% a 10 mAmp., con 500 ug de proteína. Terminada la electroforesis, se corta una tira a lo largo del gel de aproximadamente 0.3 cm. Se tiñe con la solución de azul de coomassie, se desteña y se rehidrata el gel con H₂O, se coloca nuevamente la tira del gel teñido con el resto del gel, se corta a través del gel por encima y por debajo de la banda en 130 KDa, se coloca este fragmento del gel en un mortero, se adicionan 3 ml de buffer tris 50 mM pH 7.0 y se macera. Se succiona con una jeringa de vidrio de 10 ml esteril el macerado, se quita la aguja y se coloca la jeringa en una llave de mezcla de 3 vias. Con otra jeringa de vidrio de 10 ml esteril, se toman 3 ml del adyuvante completo de Freudén, se quita la aguja y se coloca la jeringa en la llave de 3

vias, se libera el aire atrapado en las respectivas jeringas, se cierra la via de alivio y se inicia la mezcla del contenido de las 2 jeringas hasta formar una emulsion estable. Se inoculan los conejos con 2 ml cada uno con la mezcla por via subcutanea (1 ml por costado). Se inoculan los conejos por 4 semanas manteniendo las mismas condiciones.

A la 6 semana se sangran los conejos por la vena safena (oreja), un volumen de 10 ml, se coloca en un tubo esteril de vidrio. Se mantiene el tubo a temperatura ambiente, removiendo el coágulo de las paredes del tubo teniendo cuidado de no destruirlo, el suero se recupera en un tubo eppendorf, centrifugar a 3000 r.p.m. por 10 min, el sobrenadante se coloca en un tubo eppendorf, rotular y almacenar a -20°C .

2.11. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE GEL DE ACRILAMIDA A PAPEL DE NITROCELULOSA

Para la transferencia de proteínas (50,53), se preparan 2 geles de poliacrilamida en iguales condiciones. Se selecciona uno de los geles para transferir, el otro se tiñe con azul de coomassie para observar el patron de proteínas a transferir.

El gel a transferir se incuba en buffer de transferencia (Tris base 1.98 M, Glicina 0.153 M y metanol 20%) por 10 min. Se coloca a transferir a papel de nitrocelulosa en una camara especial para electrodifusión, durante 15 hr. a 300 mAmp.

2.12. INMUNODETECCION DE PROTEINAS EN BANDA (Ensayo Western)

Para la inmunodetección (53), el papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se coloca en un recipiente adecuado y se agrega albumina al 3% en buffer TBS 1X (Tris base 0.099M, NaCl 1.53M), se deja agitando 1 hr a temperatura ambiente. Se descarta la solución anterior y se incuba con el primer anticuerpo (poli-HD25, poli-cryIA(b) ó poli-cryIIIA) con una dilución 1:1000 en TBS 1X por 1.0 h a temperatura ambiente. Se decanta en un tubo limpio, se agregan 10 ml de H_2O y se decanta, se agregan 10 ml de TBS 1X + 0.05% NP40 ó Tween 20, se lava durante 5 min 2 veces, se decanta y agrega 5 ml de TBS 1X + 0.05% Tween 20 + 1:1000 del segundo anticuerpo (GAR-PO), se incuba durante 1 hr, se decanta en

un tubo limpio, se enjuaga con H_2O y se decanta, adicionar 10 ml de TBS 1X + 0.05% Tween 20 durante 5 min 2 veces y una vez con 10 ml de buffer Tris 0.5M pH 7.6, se decanta y se agregan 20 ml de solución de Diaminobencidina (2.5 mg/20 ml + 4 ul de H_2O_2) incubar por 10 min., la reacción se detiene con agua, se seca el papel de nitrocelulosa y se toma la foto.

2.12a. INMUNODETECCION EN GOTA

Para realizar este método, se utilizaron 2 ul de una suspensión de cristal espasa de cada una de las 8 cepas, en papel de nitrocelulosa. Se siguió el procedimiento descrito para inmunodetección de proteínas en banda.

2.13. MUTAGENESIS CON NITROSOGUANIDINA (NTG)

Con el propósito de obtener mutantes resistentes a antibióticos (54) se incubaron durante toda la noche las cepas de *B. thuringiensis* a 29°C en cajas de agar Luria. Se inocula con el crecimiento de las cajas en 10 ml de Luria líquido y se incuba a 29°C con agitación hasta llegar a una D.O. de 0.6-0.8 a 600 nm. (aprox. 2.5 hr.). Cuando se alcanza esa densidad óptica, agregar 100 ug/ml de NTG, se incuba agitando durante 30 min.. Se centrifugan las células y se descarta el sobrenadante al cual se le debe inactivar la NTG con NaOH 1N-2N. Se resuspenden las células en 10 ml de Luria., se incuba con agitación por 2 hrs. Centrifugar las células y concentrar en 1 ml de Luria, platear 100 ul por caja con uno de los siguientes antibióticos: Rifampicina 15ug/ml, Estreptomina 100 ug/ml, Eritromicina 0.5 ug/ml, se incuba durante toda la noche a 29°C. Las colonias que crecen se repican a cajas de agar Luria, con el doble de antibiótico.

2.14. ENTRECruzAMIENTOS EN SOLIDO

Para realizar el entrecruzamiento en sólido (55), se reactivan las cepas donadora y receptora en los respectivos medios con antibióticos. Se inocula cada una de las cepas 5 ml de medio BHI (infusión cerebro corazón 37gr/Lt.), y se incuba durante toda la noche. Se diluye 1 en 25 en 25 ml, se incuba por 5 horas a 30°C.

Se colocan 0.5 ml de la donadora y 0.5 ml de la receptora sobre papel papel de filtro esteril millipore 0.45 um. Dejar 10 min. a temperatura ambiente. Se colocan los filtros sobre medio agar BHI e incubar toda la noche a 30°C. Se recupera el crecimiento en 2 ml de medio BHI. Platear: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} en cajas con los respectivos antibioticos a fin de seleccionar la cepa receptora con el marcador de plásmido de la cepa donadora.

2.15. TRANSFORMACION POR FORMACION DE PROTOPLASTOS EN *B. thuringiensis*

La transformación por protoplastos de *B. thuringiensis* se realizó segun lo reportado por A. Helerson y et.al (47).

Se crecen las cepas de *B.T.* durante toda la noche en 2 ml de caldo Luria a 29°C. Se inoculan 10 ml de medio minimo con 0.3 ml de este crecimiento. Se crecen agitando hasta fase logaritmica tardia (80-175 U.Klett) por 5 hrs a 30°C. Se centrifuga 10 min a 2500 r.p.m. Se lavan las células con 5 ml de Tris-HCL 50mM pH 7.5. Se resuspenden en Tris-HCL 50mM pH 8.9 + sacarosa 30% esteril a una densidad de 60-120 U.Klett (aprox. 10 ml). Se transfieren 10 ml a un matraz de 125 ml, esteril, y se incuban 35-45 minutos con agitación lenta a 37°C, o hasta observar al microscopio un minimo de 90% de protoplastos. Se centrifuga y resuspende en 1 ml de LB-P (1:1) (caldo Luria-buffer fosfato KH_2PO_4 0.2M pH 6.4). Se disuelve el plásmido (100 ng) en 100 ul de celulas del paso anterior, (mismos pasos para el control), en tubo eppendorf esteril. Se adicionan 1.5 ml de polietilenglicol 6000 al 40% y agitar suavemente, incubar 10 min a 37°C con agitación lenta. Se centrifuga y resuspende en 1 ml de LB, se incuba a 37°C durante 1.5 hrs, con agitación lenta. Se platea en cajas con agar LB conteniendo el antibiótico respectivo.

2.16. TRANSFORMACION DE *E. coli* POR $CaCl_2$

Para preparar las Células para transformación (53), se crece un inoculo de celulas de *E. coli* en 10 ml caldo Luria durante toda la noche. Se inoculan 500 ml de caldo Luria con 5 ml de este crecimiento, incubar a 29°C hasta una densidad optica de 0.5 a 550

nm (5×10^7 cel/ml). Se enfria el cultivo sobre hielo por 10-30 min, se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Se resuspenden en 250 ml de una solución fría de CaCl_2 50 mM (3.67 g en 500 ml), 10 mM Tris-HCl pH 7.5. se mantiene en hielo aproximadamente 1 hr y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Se resuspenden en 25 ml de una solución fría de: CaCl_2 50 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 20% de Glicerol. Se alicuota en tubos esteriles preenfriados y congelar rapidamente en hielo seco con ETOH o nitrogeno liquido, y almacenara -70°C.

Para realizar la transformación se prepara una solución de 100 ng del plásmido a transformar, en 100 ul de TCM (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM CaCl_2 , 30-50 mM MgCl_2). Adicionar 100 ul de células competentes, se mezcla inmediatamente. Incubar a 0°C por 30-60 min. Se mantiene a temperatura ambiente (25°C) por 10 min. Se adiciona 1 ml de caldo Luria y se incuba a 37°C por 1 hr con agitación. Se platea en cajas de agar LB con el antibiótico respectivo. Se realiza control de eficiencia de transformación, así como control negativo incubando las células en solución sin plásmido.

2.17. TRANSFERENCIA DE GELES DE AGAROSA A PAPEL DE NITROCELULOSA

La transferencia de geles de agarosa a papel de nitrocelulosa (50), se hace colocando el gel en un recipiente adecuado y se adicionan 100 ml de HCL 0.25N, se agita suavemente por 15 min. Se descarta el líquido y se adicionan 100 ml de una solución de NaOH 0.5M y NaCl 1.0M, se agita por 20 min. Se descarta el líquido y se adicionan nuevamente otros 100 ml de la solución anterior, se agita por 25 min. y se desecha el líquido. Se adicionan 100 ml de una solución de: Tris 0.5M pH 7.5, NaCl 1.5M, se agita durante 45 min. Se coloca el gel sobre un puente de papel whatman sumergidos ambos lados en buffer SSC 6X (NaCl 0.9M, citrato de sodio 0.3M) pH 7.0). Sobre el gel se coloca papel de nitrocelulosa humedecido con buffer SSC 6X, marcando la orientación de los carriles. Se coloca encima del papel de nitrocelulosa otro papel whatman, del mismo tamaño que el gel y encima de esto se colocan unos 10 cm de papel absorbente. Se deja a temperatura ambiente toda la noche, a fin de permitir la transferencia del ADN al papel de nitrocelulosa. Se seca el papel de nitrocelulosa 2 horas a 80°C, en un horno de vacío.

2.18. MARCAJE DE DNA CON P³²

El ADN fue marcado por nick translation, usando DNA polimerasa de *E. coli* en presencia de (α P³²)dCTPy (α P³²)dATP, siguiendo el protocolo descrito por Rigby (44).

2.19. HIBRIDIZACION DE DNA CON SONDA RADIOACTIVA

Las hibridizaciones se realizaron tipo southern

El papel de nitrocelulosa con el DNA transferido se mete en una bolsa de plástico y se humedece con la siguiente solución de prehibridización, para un volumen final de 5 ml se utiliza buffer Denhard 10X de una solución stock de Buffer Denhard 50X (Ficoll 0.5 gr, Polivinilpirrolidona 0.5 gr, BSA 0.5 gr, volumen final 50 ml), buffer SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M), buffer fosfatos 20X SSPE (3.6M NaCl, 0.2M NaH₂PO₄·H₂O, 20 mM EDTA, pH 7.4), posteriormente se le agrega ADN de timo de ternera (5mg/ml), previamente hervido 10 min y enfriado en hielo durante 5 min. La bolsa se sella, se incuba mínimo 2 hrs. a 65°C. La solución de prehibridización se descarta y se agrega la solución de hibridización la cual contiene buffer Denhard 10X, buffer SSC 20X, buffer fosfatos SSPE 20X, adicionado con DNA timo de ternera (5mg/ml), más 1x10⁶CPM/carril de DNA marcado con P³²; que en este caso fue el plásmido pBt200 que lleva el gen cry IA(b).

Los ADN: deben de estar previamente hervidos 10 min. y enfriados en hielo durante 5 min. Sellar la bolsa y repartir por todo el filtro y colocar en caja de acrílico a 65°C durante toda la noche.

Para lavar los filtros al final de la hibridización, abrir la bolsa por arriba y agregar 5 ml de la solución 1 (SSC 2X + SDS 10% a 65°C). Se desecha el volumen contenido en la bolsa en un contenedor de material radiactivo. Abrir toda la bolsa y colocar el filtro en la solución 1 por 10 min a 65°C, desecha y agregar 500 ml de la solución 2 (SSC 0.1X+ SDS 0.1% a 65°C). Incubar a 65°C por 20 min, desecha el líquido y agregar 500 ml más de la solución 2., incubar 20 min a 65°C. Desecha el líquido y agregar 500 ml de solución 3 (SSC 0.1X), incubar 20 min a temperatura ambiente. Secar el filtro 5 min a 65°C; pegar el filtro en un cartón, cubrir con papel megapack, colocar en el casset para autoradiografía y en la oscuridad colocar la película, incubar a -70°C. por 24 hrs. Revelar la autoradiografía.

2.20. HIBRIDIZACION EN COLONIA

Para realizar la hibridación en colonia se siguió el método descrito en Maniatis (50).

Se colocan los filtros de papel de nitrocelulosa entre dos piezas de papel whatman 3MM y se esteriliza a 120°C por 20 minutos. Se dejan secar los filtros. Se coloca el filtro sobre la caja de petri, el filtro deberá humedecerse uniformemente. Se pican las colonias aisladas a partir de la caja original e inocular a una nueva caja y al filtro, cada colonia debe corresponder al lugar original. Se incuban las cajas durante la noche a 37°C . Para la lisis y desnaturalización se colocan los filtros (sobre los cuales las colonias deberan ser visibles) con pinzas sobre una pieza de papel whatman 3MM (las colonias deben quedar hacia arriba), previamente humedecido con una solución de NaOH 0.5N. Se dejan los filtros durante 8 min. Las colonias deben tener aspecto brillante, si este no es el caso, se dejan 10 minutos más.

Para la neutralización, se coloca el filtro 3 minutos sobre un papel whatman 3MM previamente humedecido con una solución Tris-HCL 1M pH 7.5, repite una vez este paso. se dejan los filtros durante 5 min sobre una pieza de whatman 3MM, humedecido con Tris-HCL 0.5M pH 7.5, NaCL 1.5M. Se coloca el filtro en papel whatman 3MM hasta que se seque. Se sumerge el filtro 5 veces en etanol absoluto. Se coloca el filtro sobre papel whatman 3MM, las colonias deben estar en la parte superior. Se sumerge el filtro 5 veces en cloroformo. Se seca el filtro sobre papel whatman 3MM, se sumerge el filtro en una solución de NaCL 0.3M durante 3 min. Se seca el filtro a temperatura ambiente. Se hornea el filtro a 80°C por 2 h. Cumplido este tiempo el filtro queda listo para prehibridizar e hibridizar.

2.21. PURIFICACION DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Para purificar ADN de geles de agarosa se siguió el método descrito por Maniatis (50).

Se corre un gel preparativo de agarosa de Tris-Boratos-EDTA 1X por 3 h a 60 volts, el cual posee el DNA tratado con enzimas de restricción, posee un pozo para colocar el marcador de peso molecular, se utilizaron 3 ul de λ -HindIII.

Cortar a lo largo del gel una franja que contenga completo el

carril del marcador peso molecular y una porción de 2-3 mm del carril que posee el DNA digerido. Teñir con Bromuro de etidio para localizar las bandas con UV de onda corta, igualar con el resto del gel y observar en el transiluminador de UV de onda larga.

Marcar con una hoja afilada por la región inferior de la banda 1-2 mm, y por el frente de la posición de la banda de interés y hacer una ranura penetrando en el gel. Con pinzas colocar una tira de papel DE81 dentro de la ranura, colocar el gel dentro de la cámara, desalojar el aire atrapado en la base del papel, iniciar nuevamente la electroforesis a 100 volts por 30 min. Observar nuevamente la porción de gel teñido y si la banda de interés ha pasado la marca final, se asume que el fragmento de DNA ha quedado atrapado en el papel. Retirar la tira de papel con la pinzas y colocarla en una jeringa de plástico de 1 ml, empujar el papel con el embolo de la jeringa en un tubo de 15 ml de fondo conico. Lavar 3 veces con 200 ul de solución de lavado (0.1M NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8.0), centrifugar a 2000 rpm por 3 min cada una, observando la columna (jeringa) en cada lavada, no debe quedar liquido en el cuerpo ni en la punta. Sacar la jeringa del tubo y colocar un tubo eppendorf sin tapa dentro del tubo y colocar la jeringa dentro del tubo eppendorf. Eluir el DNA con 200 ul de NaCl 1M 3 veces a 2000 rpm por 3 min. Retirar la jeringa, sacar el tubo eppendorf y hacer una extracción fenol-Cloroformo.

Adicionar 2 volúmenes de etanol a -20°C , dejar a -20°C durante toda la noche. Centrifugar a 7000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante. Secar al vacío en savant por 10 min. Resuspender en 400 ul de H_2O destilada esteril. Precipitar adicionando 1/10 de acetato de sodio 3M pH 4.5 del volumen de resuspensión y 2 vol de etanol a -20°C , dejar a -20°C por 2 h. Resuspender en buffer TE (Tris 10mM + EDTA 1mM pH 8.0) y mantener a -20°C

2.22. REACCIONES ENZIMATICAS DE RESTRICCIÓN Y DE LIGACION

1- Endonucleasas de restricción

Todas las enzimas de restricción usadas son de Biolabs Inc. Se adicionó a la mezcla de reacción 1/10 del volumen del buffer 10X correspondiente de la enzima usada, los volúmenes finales de reacción fueron 10 ul. Las enzimas utilizadas son BamHI, HincII, HhaI, EcoRI, DraI, HindIII.

Las reacciones con las endonucleasas fueron incubadas a 37°C, durante el tiempo requerido de acuerdo con la actividad de cada enzima, y despues detenidas incubando a 65°C por 5 min, o adicionando 1/3 del volumen de mezcla inactivadora (urea 10M, cianol de xileno 0.05%, azul de bromofenol 0.05%, en agua).

Algunas de las reacciones fueron extraidas con un volumen de fenol saturado y un volumen de cloroformo y precipitadas con 2 volúmenes de etanol.

2- Ligación del DNA

Para las reacciones de ligación se utilizó ligasa de DNA del fago T4 (boehringer mannheim). Las ligaciones se hicieron con 1/10 del buffer de ligasa y ATP 0.5 mM a 12°C por 14 horas.

RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*.

Para la realización de este trabajo se partió de 8 cepas de *B.t.*, descritos en materiales y métodos.

3.1.1. PERFIL DE PLASMIDOS.

Con el fin de identificar el número de plásmidos que portan el gen de la δ -endotoxina, se procedió a la purificación de los plásmidos de las 8 cepas de *B. t.*

Siguiendo el protocolo reportado por Kronstand et al (40), se obtuvo el perfil de plásmidos para las 8 cepas. Como se observa en la figura 4, todas las cepas presentan varios megaplásmidos y plásmidos pequeños. En la tabla 7 se numeran los plásmidos de cada cepa los cuales van desde 4 a 11 plásmidos dependiendo de la cepa y pesos moleculares de 1 a 150 MDa.

3.1.2. HIBRIDIZACION CON EL GEN DE *CryIA(b)* DE LA SUBESPECIE *berliner* 1715.

Conocido el perfil de plásmidos, el siguiente paso fué determinar cuantos de estos plásmidos codifican para la δ -endotoxina. Se siguió el protocolo de hibridización tipo southern descrito en materiales y métodos, utilizando como sonda el gen estructural *cryIA(b)* específico contra lepidópteros de la cepa de *B.t.* subespecie *berliner* 1715, marcada con P³². En la figura 5 se muestra el resultado de la hibridización con este gen. Los plásmidos que presentan homología con la sonda, corresponden a plásmidos de alto peso molecular (tabla 8).

En este análisis observamos que algunas cepas presentan

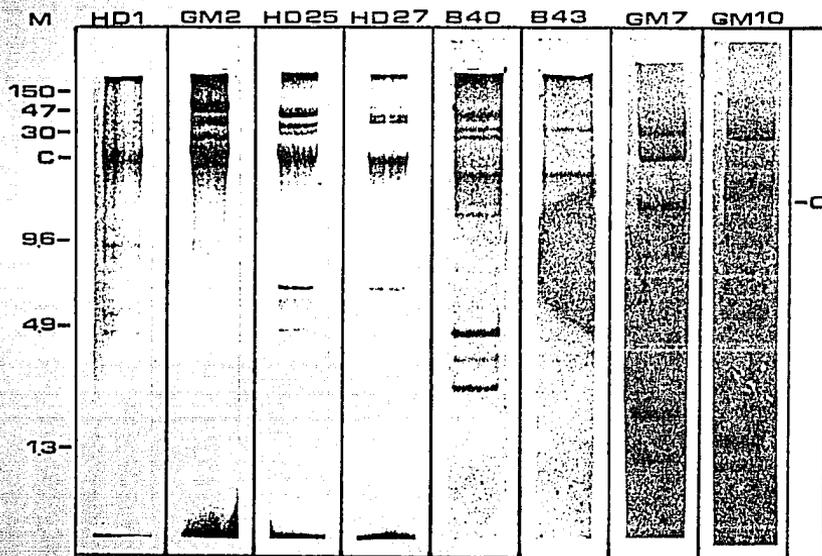


FIG.4. PATRON ELECTROFORETICO DEL PERFIL DE PLASMIDOS DE 8 CEPAS DE *B. thuringiensis*.

C: Cromosomal , M: Marcadores de peso molecular

CEPA	MEGAPLASMIDOS	PLASMIDOS PEQUEÑOS	TOTAL PLASMIDOS PRESENTES
HD1	3	6	9
GM2	3	2	5
HD25	3	8	11
HD27	3	5	8
B40	3	3	6
B43	1	3	4
GM7	2	4	6
GM10	3	5	8

TABLA 7. NUMERO DE PLASMIDOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*.

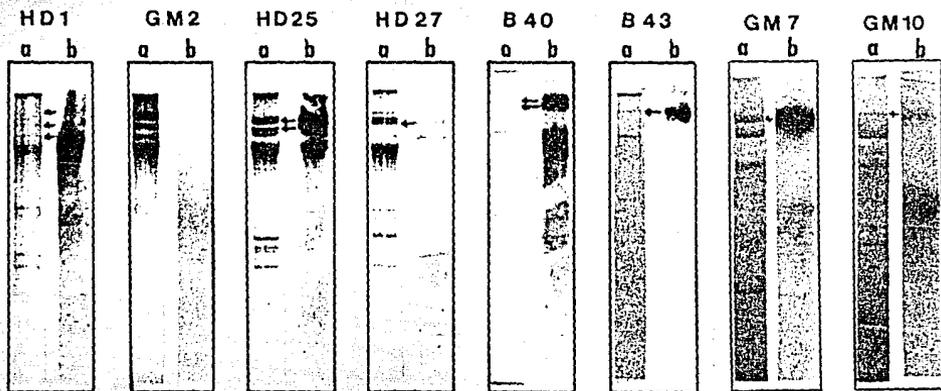


FIG.5. HIBRIDIZACION DEL PERFIL DE PLASMIDOS DE 8 DIFERENTES CEPAS DE *B.thuringiensis* CONTRA EL GENE DE LA δ -ENDOTOXINA SUBESP. berliner 1715 .
Gel Agarosa 0.75%.

a: Patrón electroforetico de plásmidos de las cepas
b: Hibridación contra el gene de la δ -endotoxina subesp. berliner 1715 *CryIA(b)* .

CEPA	NUMERO DE MEGAPLASMIDOS PRESENTES	NUMERO DE MEGAPLASMIDOS HOMOLOGOS CON LA SONDA
HD1	3	3
GM2	3	0
HD25	3	2
HD27	3	1
B40	3	2
B43	1	1
GM7	2	1
GM10	3	1

TABLA 8. NUMERO DE MEGEPLASMIDOS DE DIFERENTES CEPAS, HOMOLOGOS CON EL GEN DE δ -ENDOTOXINA subespecie berliner 1715

hibridización con un solo megaplásmido (HD27, B43, GM7, GM10), otras cepas hibridizaron con 2 o 3 plásmidos (HD1, HD25, B40), lo cual podría sugerir que contienen más de un gen de δ -endotoxina. La cepa HD27 presenta una sola banda con hibridización muy baja, lo cual puede indicar que se trata de un gen diferente con baja homología con el gen *cryIA(b)*. Por último la cepa GM2 que presenta 3 megaplásmidos no presenta homología con la sonda utilizada.

3.1.3. PURIFICACION DE LA TOXINA Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN CONEJO.

Como algunas cepas presentan más de un plásmido que codifica para la δ -endotoxina, se quiso saber si realmente significa que éstas cepas producen más de una δ -endotoxina. Las 8 cepas de B.t. se crecieron hasta la fase de esporulación, se determinó proteína total siguiendo el método de Lowry y se realizó el patrón electroforético de proteína total de una solución de cultivo de células rotas, en gel de acrilamida al 7%, con 10 ug de proteína de cada cepa. En la figura 6 se observa el patrón de proteína que estas cepas presentan durante la esporulación. La formación del cristal se revisó a lo largo del cultivo por microscopía utilizando una coloración simple con el colorante cristal violeta. Posteriormente procedimos a la purificación del cristal, según lo reportado por Thomas y Ellar (51), el cual involucra centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de sacarosa. En la figura 7 se observa el patrón electroforético de las proteínas asociadas con el cristal. La cepa HD1 presenta 3 proteínas, una de bajo peso molecular aproximadamente 60 Kb, la cual corresponde a proteína CryII y 2 de alto peso molecular que corresponde a las proteínas CryIA(a) y CryIA(b). La cepa HD25 también presenta 3 proteínas 2 de alto peso molecular y 1 que comigra con la proteína CryII de la HD1. Las cepas GM7 y B40

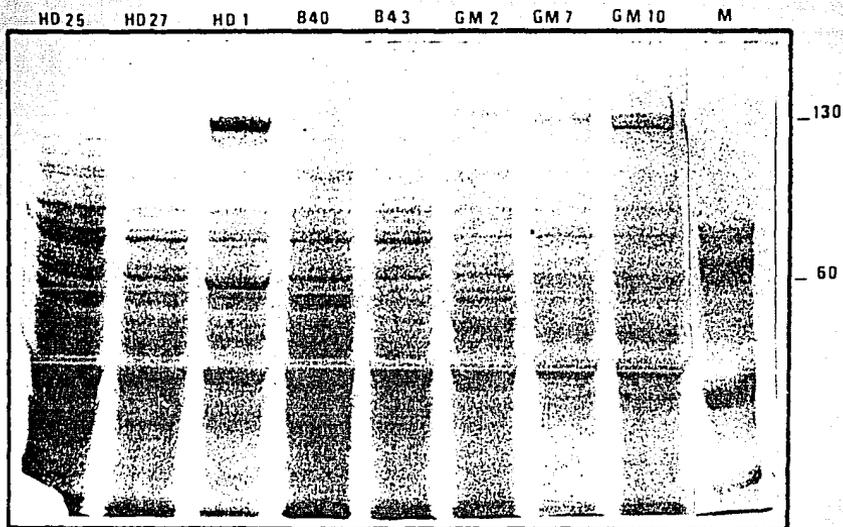


FIG.6. PATRON ELECTOROFORETICO DE PROTEINA TOTAL DE 8 CEPAS DE *B. thuringiensis*.

Gel Acrilamida 7%, segun Laemmli (52).

M: Marcadores de peso molecular

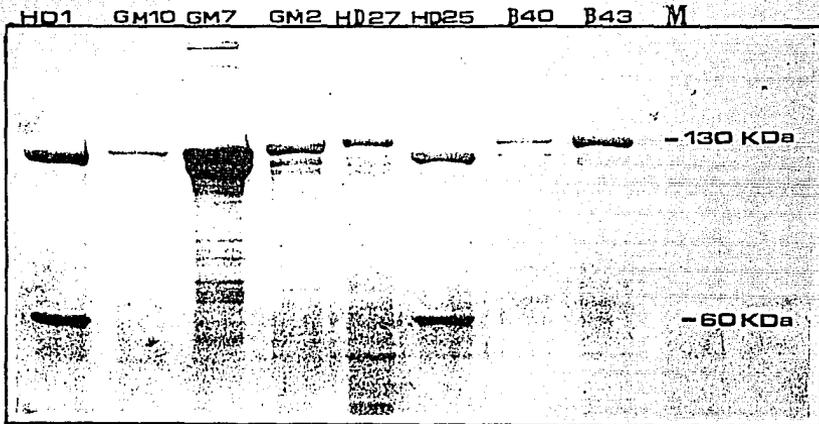


FIG.7. PATRON ELECTROFRETICO DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS CON EL CRISTAL PURIFICADO DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.

GEL ACRILAMIDA 7%, segun Laemmli (52).

M: Marcadores de peso molecular.

presentan 2 proteínas de alto peso molecular y las cepas restantes (HD27, GM2, GM10 y B43) presentan una sola proteína asociada al cristal. Dada la gran homología reportada entre las diferentes proteínas CryI específicas contra lipídopteros, se quiso saber que tan relacionadas entre sí están las proteínas Cry de estas 8 cepas. Para esto se elaboraron anticuerpos policlonales en conejos, utilizando únicamente las proteínas de alto peso molecular de la cepa HD25. La figura 8 muestra la purificación del cristal de la cepa HD25 después de 3 pasos consecutivos de sacarosa.

La banda correspondiente a las proteínas de 130 KDa, se cortó del gel y se mezcló con el adyuvante completo de Freudén. Tres conejos se inocularon con 100 ug de proteína de este preparado, los inóculos se repitieron cada 8 días. Al mes y medio se recuperó el suero siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Con este suero se procedió a la inmunodetección de las proteínas asociadas al cristal de las cepas restantes. Las proteínas de las 8 cepas se electrotransferieron a papel de nitrocelulosa, según la técnica descrita para Western y la inmunodetección se realizó utilizando el suero policlonal HD25 diluido 1:1000 en buffer PBS. Como segundo anticuerpo se utilizó un suero anti-IGg de conejo producido en cabra (Sigma) acoplado a la enzima peroxidasa. Como se aprecia en la figura 9, las cepas HD27, GM7, GM10 y B43 presentan una sola banda de proteína que reacciona con el anticuerpo poli-HD25. Las cepas HD25, HD1 y B40 presentan 2 proteínas que reaccionan con el poli-HD25. Solamente la cepa GM2 no presenta reacción con el anticuerpo. En la tabla 9 se resumen las diferencias entre estas cepas, observándose que las cepas que tienen más de un plásmido con el gen que codifica para la δ -endotoxina (HD25, HD1 y B40) presentan varias proteínas de δ -endotoxina asociadas con el cristal. Las cepas que tienen un solo plásmido con el gen de δ -endotoxina presentan una sola proteína y únicamente la cepa cepa GM2 caracterizada por la

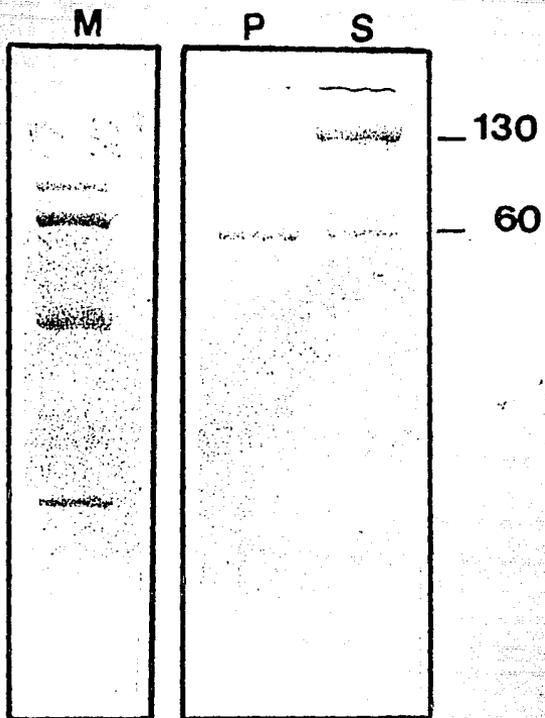


FIG.8. PATRON ELECTROFORETICO DE LA PROTEINA DE CRISTAL PURIFICADO DE LA CEPA DE *B.thuringiensis*. HD25
Gel Acrilamida 7%, segun Laemmli (52).
M: Marcadores de peso molecular
P: Protoxina solubilizada con NaOH 0.2N, pH 10.5
S: Protoxina solubilizada con Na₂CO₃, pH 10

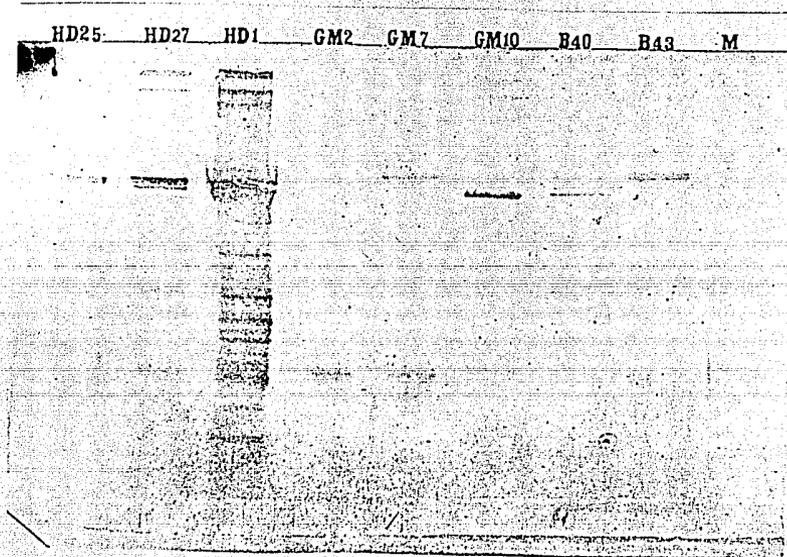


FIG.9. INMUNO BLOT DE PROTEINA DEL CRISTAL DE δ -ENDOTOXINA DE 8
CEPAS DE *B. thuringiensis*.
Anticuerpo utilizado: poli-HD25.

CEPA	N° DE PLASMIDOS HOMOLOGOS CON LA SONDA	N° BANDAS EN PROTEINAS	PROTEINAS QUE REACC CON EL ANTICUERPO
HD25	2	3	2
HD27	1	1	1
HD1	3	3	2
GM2	0	1	0
GM7	1	2	1
GM10	1	1	1
B40	2	2	2
B43	1	1	1

TABLA 9. NUMERO DE PROTEINAS QUE REACCIONAN CON EL ANTICUERPO

Universidad de Nuevo León como atóxica a larvas de lepidópteros o dípteros, no presenta hibridización con la sonda *CryIA(b)*, ni inmunoprecipitación con el anticuerpo poli-HD25. Se puede afirmar que la cepa GM2 no se trata de una mutante estructural en el gen de la toxina sino que posiblemente produce una toxina muy diferente a la que actúa en lepidópteros y por lo tanto podría ser activa contra otra clase de insectos por ejemplo, coleópteros. A fin de discernir si se trata de una proteína semejante a las reportadas contra insectos coleopteros (*CryIIIa*), se procedió a la inmunodetección en gota, utilizando anticuerpos poli-*CryIIIa* y poli-*CryIA(b)*, las cuales nos fueron facilitados por la compañía Plant Genetic Systems.

El anticuerpo poli-*CryIA(b)* reaccionó con todas las cepas excepto con la cepa GM2, confirmando que las 7 cepas codifican para una proteína contra lepidópteros.

El anticuerpo poli-*CryIIIa* no reaccionó con ninguna de las cepas (Fig.9A).

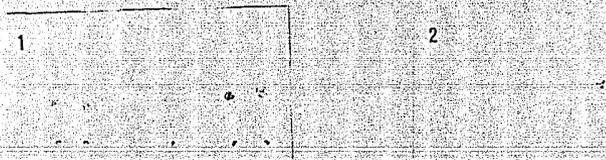
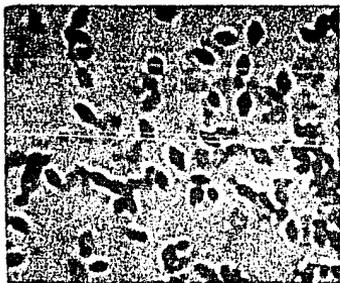


FIG. 9A. INMUNODETECCION EN GOTA DE LAS OCHO CEPAS DE B.t.
1: anticuerpo polyCryIA(b), 2: anticuerpo polyCryIIIA.
Volumen de muestra aplicada: 1 μ l.

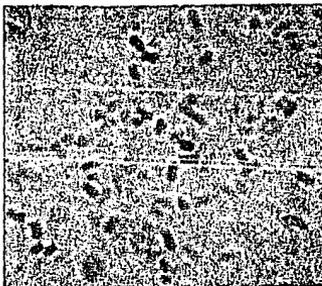
3.1.4. ESTRUCTURA DEL CRISTAL PRODUCIDO POR CADA UNA DE ESTAS CEPAS

Todas las cepas que hibridizaron con la sonda y con el anticuerpo (HD1, HD25, HD27, B40, B43, GM7 y GM10) producen un cristal bipiramidal y la cepa GM2 produce un cristal rectangular, en la foto 1 se observa la forma de los cristales de la cepa GM7 y GM2.

GM7



GM2



3.2. MANIPULACION GENETICA DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.

El segundo objetivo de este trabajo consiste en establecer una estrategia que permita manipular genéticamente a cepas de *B.t.* con el objetivo de cambiar o ampliar el espectro de su actividad biocida. Para ello se planteó utilizar el proceso de conjugación entre cepas de *B.t.* a fin de transferir los plásmidos que codifican para la δ -endotoxina de una cepa a otra. Con el propósito de poder identificar a las transconjugantes y manipular

la transferencia de plásmidos entre diferentes cepas se plantearon 2 estrategias: una fue marcar con un gen de resistencia a antibiótico el plásmido de *B. t.* que codifica para δ -endotoxina con ayuda de un transposon. Se decidió utilizar el transposon Tn916 el cual fue aislado de *Streptococcus faecalis* y que se expresa en bacterias Gram positivas. Este transposon confiere resistencia a Tetraciclina.

La segunda estrategia fue clonar el gen que codifica para δ -endotoxina junto a un gen de resistencia a antibiótico en un plásmido que no tiene origen de replicación en Gram positivas, a fin de que una vez dentro de *B.t.*, este plásmido se integre por un recombinación, integrando así el gen de resistencia junto al gen la δ -endotoxina, con lo que se lograría marcar el plásmido de nuestro interés.

3.2.1. CONSTRUCCION DE CEPAS RECEPTORAS DE PLASMIDO

Las 8 cepas de *B.t.* son resistentes naturales a Ampicilina. A fin de obtener cepas receptoras resistentes a otros antibióticos, las cepas HD27, GM2, GM7 y GM10 fueron mutagenizadas con nitrosoguanidina (NTG), siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. En la tabla 10 se describe el número de cepas resistentes a Rifampicina, Estreptomina y Eritromicina que obtuvimos al final de la selección de la mutagénesis. La formación del cristal de estas cepas mutantes se siguió por microscopía con coloración simple en aceite de inmersión, a fin de observar que la mutación no afectaba la producción de cristal insecticida.

3.2.2. CONSTRUCCION DE CEPAS DONADORAS, MARCADAS CON EL TRANSPOSON Tn916.

Con el propósito de marcar el plásmido que codifica para

Cepa de <i>B. th.</i>	A N T I B I O T I C O		
	Rifampicina (30 ug/ml)	Estreptomina (200 ug/ml)	Eritromicina (1 ug/ml)
HD27	1	1	1
GM2	1	-	-
GM7	1	-	-
GM10	-	1	-

TABLA 10. CEPAS DE *B. thuringiensis* RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

δ -endotoxina con un gen de resistencia a antibiótico, se utilizó el plásmido pBC16 el cual es un plásmido transferible que posee el transposón Tn916, que contiene el gen de resistencia a Tetraciclina. Este plásmido contiene la región de ADN necesaria para que se pueda transferir de una cepa a otra pero requiere que en la cepa que lo porte lleve la información Trans para movilizar plásmidos por conjugación. Con el fin de introducir el plásmido pBC16 en *B.t.* se siguió el protocolo de entrecruzamiento en liquido descrito en materiales y métodos. Como cepa donadora se utilizó a la *Streptococcus faecalis*, que posee el plásmido pBC16. Como cepas receptoras se utilizaron *B.thuringiensis* HD1 y HD25. La selección fue realizada en LB suplementado con Amp y Tc. No se pudieron seleccionar transconjugantes resistentes a tetraciclina. Se decidió entonces realizar entrecruzamientos usando la cepa de *B. subtilis*, BS1 estreptomycin resistente (Sm^R), como paso intermedio entre *S. faecalis* y *B. thuringiensis*. Las transconjugantes Amp^R se seleccionaron en medio agar luria $Amp^R Tc^R$. La tabla 11 resume las cepas transconjugantes y su frecuencia de conjugación.

Estas transconjugantes fueron crecidas en medio agar LB $Amp^R Tc^R$ hasta esporulación y por microscopía con coloración simple con cristal violeta se observó la producción del cristal. De esta manera contamos con cepas de *B.t.* que contienen el plásmido pBC16. Estas cepas podrían ser utilizadas en experimentos de conjugación ya que al contener el plásmido pBC16 se tiene un marcador de conjugación de tal manera que al transferir el plásmido pBC16 también se pueden transferir otros plásmidos. Con el fin de facilitar el análisis de transferencia de plásmido de δ -endotoxina por conjugación entre diferentes cepas de *B.t.* se propuso marcar al plásmido de la toxina con un marcador de resistencia a antibiótico. Como el plásmido pBC16 contiene el Tn916 se intentó inducir la transposición del Tn916 a fin de buscar una resultante con el Tn916 en el plásmido que codifica para δ -endotoxina.

Cepa Receptora Amp ^r Tc ^r	Frecuencia de Conjugación
HD1	2.0×10^{-6}
HD25	1.5×10^{-6}
HD27	1.0×10^{-7}
B40	5.0×10^{-6}
B43	0.07×10^{-6}
GM2	0.12×10^{-6}
GM7	5.0×10^{-6}
GM10	1.2×10^{-6}

TABLA 11. Frecuencia de Conjugación de cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas en medio agar luria Amp^rTc^r.

Siguiendo el protocolo de transformación para *B. thuringiensis* descrito en materiales y métodos; se transformaron con el plásmido pBC16 a las cepas HD1 y HD25. Las transformantes Amp^rTc^r se obtuvieron con una frecuencia de 10² transformantes/ug ADN, y también son capaces de producir el cristal al crecerlas en medio LB Amp^rTc^r. La cepa transformante HD1 Amp^rTc^r, se utilizó ahora como donadora en entrecruzamientos con GM2 y GM7 Rif^r y con HD27 y GM10 Sm^r como receptoras. La frecuencia de conjugación fue muy baja, de la transconjugante HD27 Sm^rTc^r se obtuvieron solo 38 colonias y dos colonias de la GM7 Rif^rTc^r; no se obtuvieron transconjugantes GM10 Sm^rTc^r y GM2 Rif^rTc^r. Las transconjugantes se crecieron en medio agar Luria Sm^rTc^r y Luria Rif^rTc^r respectivamente, la formación del cristal se siguió por observación al microscópio con coloración simple. A las cepas Rif^rSm^r que formaron cristal, se les realizó purificación de plásmidos y posteriormente se realizaron hibridizaciones con el plásmido pBC16 como sonda radiactiva. En la autoradiografía (Fig. 10) se observa una banda de hibridización en cromosoma. No se observa ninguna banda a nivel de plásmidos. El transposon Tn916 puede transponer a plásmido y también a diferentes sitios sobre el cromosoma. Aparentemente lo que obtuvimos al transformar a *B.t.* con este Tn916, fue una transposición al cromosoma y por esta misma razón al realizar los entrecruzamientos con las otras cepas de *B.t.*, se obtuvo una frecuencia muy baja de conjugación.

3.3. CLONACION DEL GEN DE δ -ENDOTOXINA JUNTO A EL GEN DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICO DEL PLASMIDO pBS42.

3.3.1. Vector de clonación

Con el propósito de marcar el plásmido que codifica para el gen de la toxina, se planteó la estrategia de clonar el gen de la δ -endotoxina junto a un marcador de resistencia a antibiótico en un vector no replicable en *B.t.*. De tal manera que al introducir

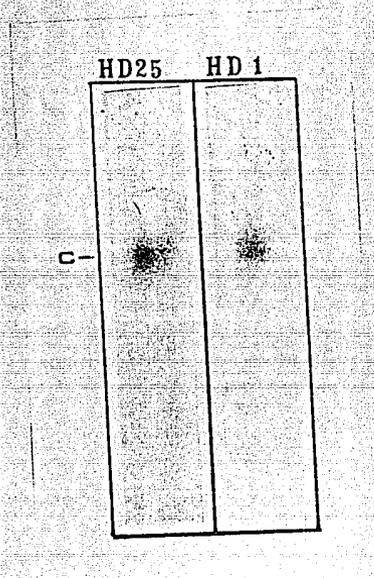


FIG.10. HIBRIDIZACION DE CEPAS TRANSFORMANTES HD25 y HD1 Tc^r , CON EL PLASMIDO pBC16 COMO SONDA RADIOACTIVA.
C: CROMOSOMAL

esta construcción en una cepa de *B. t.* por recombinación entre los genes de δ -endotoxina tendríamos el marcador de resistencia a antibiótico en el mismo plásmido que codifica para la toxina.

Se decidió utilizar el plásmido pBS42, este es un vector que codifica para resistencia a cloramfenicol y que presenta dos orígenes de replicación, uno proviene del pBR322 y funciona en bacterias Gram negativas, el otro proviene del pUB110 y es funcional en bacterias Gram positivas (fig.11).

Este plásmido se purificó siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, al efectuar una doble digestión de 10 μ g de DNA de plásmido con las endonucleasas BamHI y HincII, se pueden separar los dos orígenes de replicación.

La figura 12 muestra la electroforesis de esta digestión y se puede observar dos bandas de 2.5 Kb y 2.3 Kb; en el fragmento de 2.3 Kb se encuentra el gen de resistencia a cloramfenicol y el origen de replicación proveniente de pBR322, funcional únicamente en bacterias Gram negativas, el cual utilizamos como se verá más adelante, para clonar el gen de la δ -endotoxina.

3.3.2. Purificación del gen de la δ -endotoxina

El plásmido pBT200, posee el gen *CryIA(b)* que codifica para la δ -endotoxina. Este gen se encuentra en un fragmento de 5.4 Kb de Hha. El pBT200 se purificó de *E. coli* siguiendo el protocolo de materiales y métodos. Posteriormente se digirió con la endonucleasa HhaI, se corrió un gel de agarosa al 1% (fig. 12). Se observan 6 bandas, el fragmento de ADN de mayor peso molecular corresponde al fragmento de 5.4 Kb. que contiene el gen de *CryIA(b)*.

3.3.3. Purificación de los fragmentos

La purificación de los fragmentos de interés, es decir, el fragmento correspondiente a 5.4 Kb el cual posee el gen *CryIA(b)* y el fragmento de 2.3 Kb que porta el gen de resistencia a

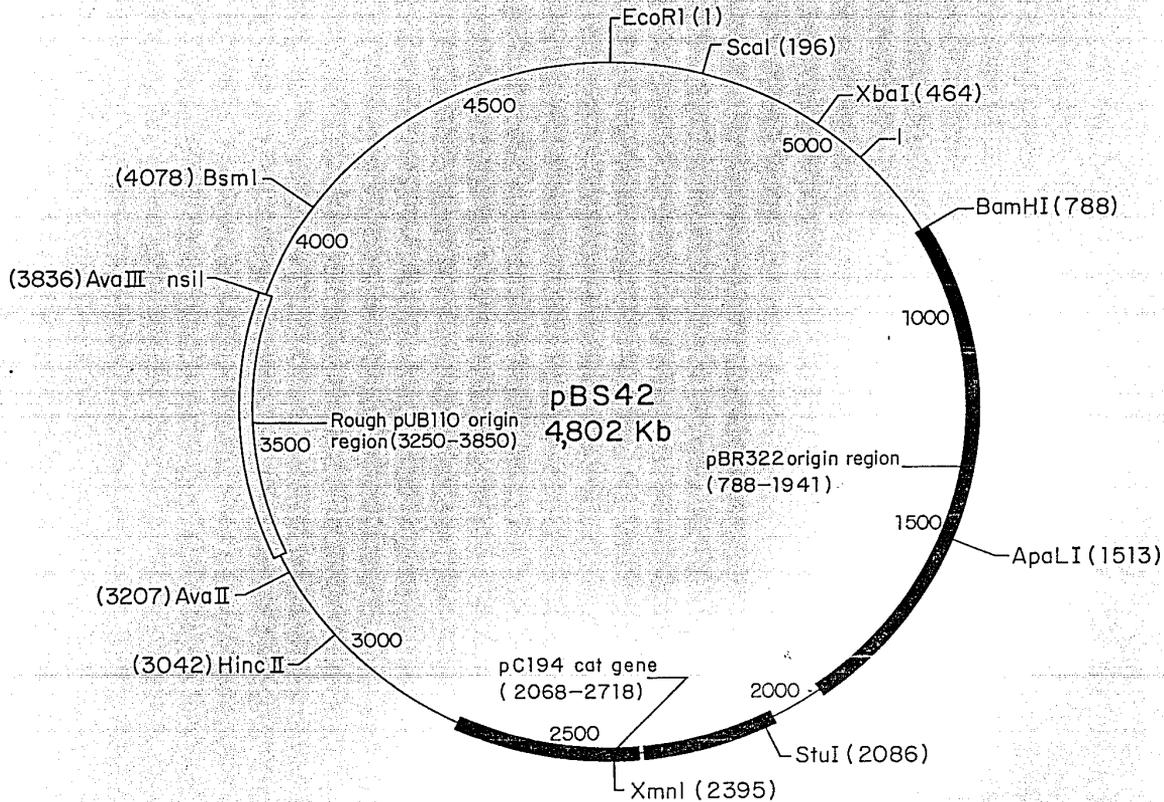


Fig 11 Plásmido pBS42

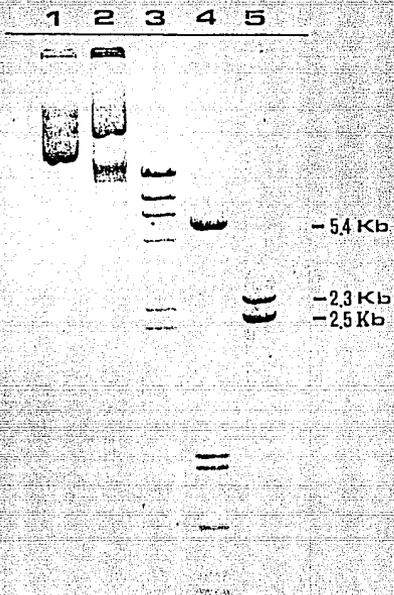


FIG. 12 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%, DEL ADN DE LOS PLASMIDOS pBt200 Y pBS42. Carril 1:pBt200, 2:pBS42, 3: Marcador de peso molecular λ -HindIII, 4:pBt200 cortado con HhaI, 5:pBS42 cortado con BamHI/HincII.

cloramfenicol, se realizó siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Posteriormente los dos fragmentos respectivos fueron tratados por una hora con la T4 DNA polimerasa a fin de convertir los extremos cohesivos a extremos rasurados, luego se realizó una extracción fenol-cloroformo y una precipitación con etanol a -70°C ; y se ligó con DNA ligasa de fago T4 a 12°C durante 12 horas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

3.3.4. Transformación en *E. coli* HB101.

El resultado de la reacción de ligasa se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* HB101, seleccionándose en cajas de medio agar luria con 20 ug/ml de cloramfenicol; se obtuvieron 100 colonias transformantes resistentes a cloramfenicol. Posteriormente se hicieron dobles repiques en cajas con medio agar Luria y 20 ug/ml de cloramfenicol incubándose a 37°C . En una de las cajas se repicaron también en tres diferentes sitios la cepa que posee el plásmido pBS42 como control. A las colonias de esta caja se le realizó hibridización en colonia utilizando el oligonucleótido RB-9 como sonda radioactiva. Este oligonucleótido es homólogo a una región del gen *CryIA(b)*. La fig.13 muestra la hibridización positiva en 18 de las 100 colonias. Los controles negativos no hibridizaron.

Posteriormente se realizaron dobles repiques de las 18 colonias que hibridizaron con la sonda, en cajas con medio agar Luria suplementado con 20 ug/ml de cloramfenicol, se incubaron a 37°C . A una de las cajas se le realizó inmunodetección siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, utilizando el anticuerpo polyclonal Poli-CryIA(b). La cepa HB101 con el plásmido pBt200, se usó como control positivo la cepa y como control negativo la cepa *E. coli* HB101. En la Fig. 14 se observa que las 6 clonas reaccionan con el anticuerpo al igual que los controles positivos. El control negativo no reaccionó con el anticuerpo indicando que la cepa receptora HB101, no produce una proteína que

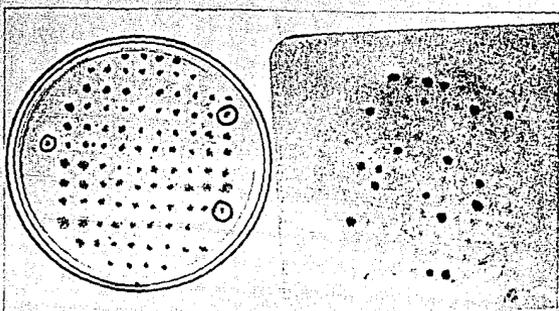


FIG.13. HIBRIDIZACION EN COLONIA DE TRANSFORMANTES CL_m^r CONTRA EL OLIGONUCLEOTIDO RB-9. Colonias crecidas en medio agar Luria con cloramfenicol 20ug/ml. Controles negativos pBS42, dentro de circulos.

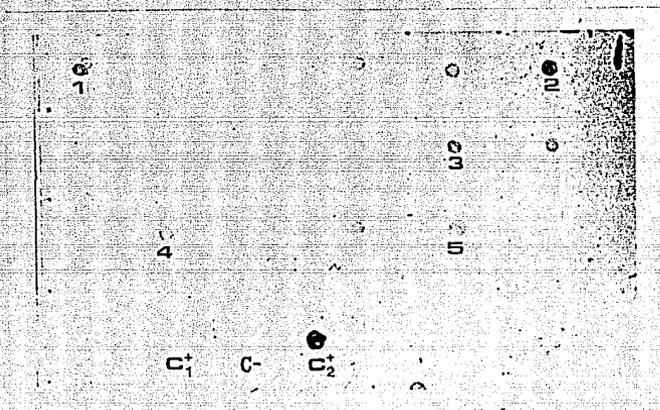


FIG.14. INMUNODETECCION EN GOTA.

Colonias 1,2,3,4,5,6, reaccion positiva con el anticuerpo CryIA(b). Controles positivos: C₁: HB101pBt200, C₂: HD1. Control negativo: C- (HB101)

reacción con el anticuerpo poli-CryA(b), por lo que se podría afirmar que las cepas resultantes contienen y expresan el gen de la δ -endotoxina.

3.3.5. Patrón de restricción del Plásmido pC1.

Para realizar el patrón de restricción se partió de la cepa 1 cloramfenicol resistente y siguiendo el protocolo de purificación de plásmidos en *E. coli*, el plásmido denominado: pC1, fue entonces digerido con varias endonucleasas de restricción. En la Fig.15 se observa el patrón de restricción de los plásmidos pC1, pBS42 y pBT200, en el cual el patrón de bandas que presenta el plásmido pC1 es diferente al patrón de bandas que presenta tanto el pBS42 como el pBT200.

Este plásmido pC1, está entonces construido con el gen que codifica para la δ -endotoxina marcado con el gen de resistencia a Clm y puede ser utilizado en procesos de transformación en *B.t.*

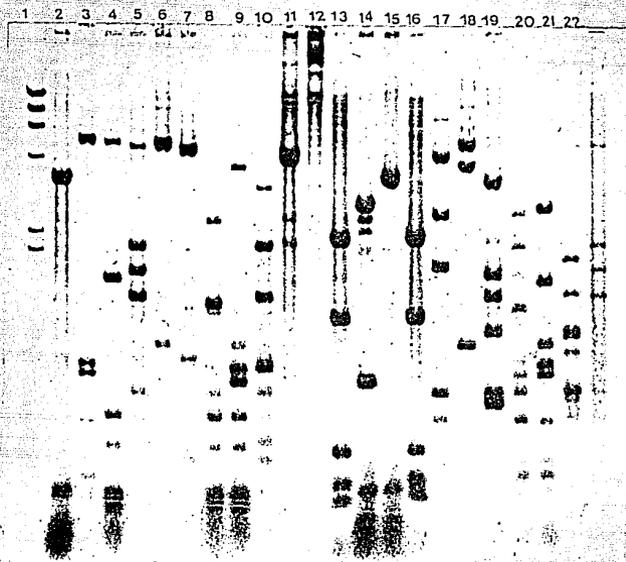


Fig. 15. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, del DNA del plásmido pC1, pBS42 y pBt200 cortados con varias endonucleasas de restricción.

El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ HindIII, los carriles: 2,3,4, muestran el patrón de restricción de HhaI, de los plásmidos pBS42, pBt200 y pC1 respectivamente; los carriles 5,6,7,11,12,13,17,18,19, muestran el patrón de restricción de EcoRI, HindIII y DraI de los plásmidos pC1, pBS42 y pBt200 respectivamente; los carriles: 8,9,10,14,15,16,20,21,22, muestran el patrón de restricción con dobles digestiones de HhaI-EcoRI, HhaI-HindIII y DraI-EcoRI, de los plásmidos pC1, pBS42 y pBt200 respectivamente.

DISCUSION

El primer enfoque utilizado para la caracterización de las cepas de *B.t.* fue la hibridización contra el gen de la δ -endotoxina *CryIA(b)*. De los datos obtenidos podemos observar que las cepas de *B.t.* poseen diferentes plásmidos cuyos pesos moleculares oscilan entre 1.5 y 150 MDa (Fig.5). Siete de las 8 cepas presentaron hibridización con el gen detector. Se corrobora con lo anteriormente reportado en la literatura que el gen que codifica para la δ -endotoxina se encuentra codificado en megaplásmido (Fig 5). De estos datos podemos concluir que 7 de las cepas presentan un gen tipo *CryI*, ya que como se mencionó existe una gran homología entre proteínas *CryI* (55% a 90%). El hecho de que siete de las cepas hayan hibridizado con este gen significa que poseen un gen parecido y por lo tanto una proteína con actividad biocida contra insectos lepidópteros. Con esta prueba no podemos discernir de cuál de los genes *Cry* se trata sólo con pruebas más finas, como por ejemplo la utilización de hibridaciones con oligonucleótidos específicos se podría diferenciar cada uno de los genes *CryI*.

Algunas cepas presentan hibridización con un solo plásmido, otras hibridizaron con 2 ó 3 megaplásmidos (Fig 5), lo que significa que por lo menos tienen 2 ó 3 genes de δ -endotoxina. Con el proposito de identificar si se trata de copias iguales de genes ó diferentes, se propone la utilización de hibridaciones con oligonucleótidos específicos contra los diferentes genes *Cry*.

Por otro lado cepas que hibridaron con un solo megaplásmido, no significa que tengan un solo gen, ya que los plásmidos son muy grandes y pudieran tener más de un gen, como lo reportado para las cepas de *B. t.* subespecie *Kurstaki* (45).

La cepa HD27 presenta muy baja homología con la sonda *CryIA(b)* utilizada. Esto nos indica que esta cepa produce una proteína contra larvas de lepidópteros, producto de un gen más alejado del gen *CryIA(b)*. Por último la cepa GM2, fue la única que no presenta homología con el gen *CryIA(b)*, es decir no posee un gen que codifique una proteína contra lepidópteros. Para determinar que tipo de proteína produce esta cepa, se propone la utilización de sondas que representen genes *CryII*, *CryIII* ó *CryIV* a fin de distinguir el tipo de gen *Cry* que contiene esta cepa. Por supuesto que este ensayo también se podría realizar con oligonucleótidos.

distinguir el tipo de gen *Cry* que contiene esta cepa. Por supuesto que este ensayo también se podría realizar con oligonucleótidos. Para saber si efectivamente estas cepas de *B. t.* producen más de una proteína δ -endotoxina, se crecieron hasta fase de esporulación, se purificó el cristal y se obtuvo el patrón electroforético de las proteínas asociadas al cristal. En la Fig 7 se observa que las cepas que presentan varios plásmidos (HD1, HD25, B40), conteniendo el gen de la toxina producen varias proteínas y las que presentan un solo plásmido de δ -endotoxina (HD27, B43, GM7, GM10), presentan una sola proteína. La cepa GM2 que no hibridizó con la sonda (gen *CryIA(b)*), presenta una sola proteína asociada al cristal y al igual que las otras cepas esta proteína presenta un peso molecular alrededor de 130-140 KDa. Con el propósito de ver que tan relacionadas están estas proteínas entre sí, se produjeron anticuerpos contra las proteínas de 130 KDa del cristal de la cepa HD25. Esta cepa se escogió porque produce 2 proteínas diferentes de alrededor de 130 KDa en el cristal. Con este anticuerpo poli-HD25 se analizaron las demás cepas, (Fig 9) confirmandose en este análisis que la cepa GM2, que no hibridizó con el gen *CryIA(b)*, presenta una proteína que no está relacionada con la proteína contra lepidópteros, indicando que es una proteína muy diferente a la de las demás cepas. Es importante señalar que no todas las proteínas reaccionan con el anticuerpo, por ejemplo las proteínas de 60 KDa de la cepa HD1 y HD25 las cuales pertenecen al grupo *CryII*, dado su peso molecular. Con el propósito de discernir si la proteína codificada por la cepa GM2, pertenece al grupo de las proteínas con actividad a coleópteros, se realizaron inmunodetecciones en gota, utilizando anticuerpos policlonales producidos contra la proteína *CryIIIA* y también anticuerpos contra la proteína *CryIA(b)*. De estos experimentos podemos concluir que las 7 cepas caracterizadas como cepas portadoras de genes *CryI*; efectivamente producen una proteína semejante a la proteína *CryIA(b)* ya que el anticuerpo poli-*CryIA(b)* reacciona contra todas ellas. Cuando se usó el poli-*CryIIIA*, no se obtuvo reacción con ninguna de las 8 cepas, lo que quiere decir que no producen una proteína semejante a las producidas por el grupo *CryIIIA*. La cepa GM2 produce un cristal de forma rectangular semejante al cristal reportado por las cepas

con actividad contra insectos coleópteros. Dado que esta cepa no presento homología con el gen para lepidópteros, ni cruzó con el anticuerpo de lepidópteros se pensó que era probable que la cepa GM2 presentara una proteína del tipo de las proteínas específicas contra coleópteros; al realizar la inmunodetección con el anticuerpo CryIIIA no se obtuvo reacción con este anticuerpo.

El anticuerpo CryIIIA, fue producido contra la proteína CryIIIA, la cual tiene un peso molecular de 73 KDa, que al ser digerida por las proteasas libera un péptido tóxico de 66 KDa, mientras que la GM2 produce una proteína de 130 KDa, no se conoce el tamaño del péptido tóxico de esta proteína al ser digerida por enzimas proteolíticas. Con el fin de establecer si la GM2 produce una proteína contra coleópteros se propone que esta proteína sea digerida y se realice nuevamente la inmunodetección con el anticuerpo poli-CryIIIA. A si mismo realizar hibridizaciones utilizando el gen completo CryIIIA, lo cual ayudaría a resolver este problema.

Con el fin de tener un análisis más específico, se propone seguir la misma metodología, pero utilizando anticuerpos monoclonales que sean capaces de reaccionar específicamente con cada una de las proteínas Cry descritas. La utilización de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína CryIA(b) y la proteína CryIIIA, permitió de una manera general determinar cuáles de las proteínas producidas son contra insectos lepidópteros y cuáles son contra insectos coleópteros. Este debe ser un paso importante y necesario a realizar antes de la utilización de anticuerpos monoclonales más específicos, podemos concluir que teniendo anticuerpos policlonales, monoclonales y oligonucleótidos específicos contra genes Cry se puede realizar un análisis completo de cepas de *B.t.* usando la misma metodología desarrollada en este trabajo. De esta manera se pueden caracterizar muchas cepas e inclusive se pueden encontrar nuevas cepas que presentan nuevos genes y nuevas toxinas, lo cual sería de gran interés para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas.

Después de un análisis como éste, el paso a seguir son los bioensayos, determinando las concentraciones letales (LD₅₀) necesarias para matar a diferentes larvas de insectos. En Monterrey se realizaron bioensayos con algunas de las cepas

utilizadas por nosotros HD1, GM2, GM7 y GM10 (tabla 12). Se utilizaron 3 diferentes larvas de insectos lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*, *Heliotis virescens*, *Trichoplusia ni*). La cepa GM2 no es activa contra ninguno de estos lepidópteros. Es importante destacar que las cepas GM7 y GM10 presentan actividades bioinsecticidas 20 veces mayores que la cepa HD1. Esto se puede deber a que el gen de la cepa HD1 sea diferente al de las cepas GM7 y GM10. Sería muy interesante ver las diferencias entre las proteínas por estas cepas con anticuerpos monoclonales y conocer si los genes son exactamente iguales, o si son proteínas diferentes.

El segundo objetivo propuesto en este trabajo fue el establecer una estrategia que permita la manipulación genética de las cepas de *B.t.*, con el fin de obtener una cepa que exprese 2 ó más genes de diferentes orígenes y de esta manera amplificar el rango de acción de la toxina. Se escogió el proceso de conjugación, ya que la conjugación permite que genes de δ -endotoxina contenidos en plásmido de *B.t.* puedan ser transferidos a otras cepas como *B. cereus* y *B. subtilis* ó *B. thuringiensis*. La conjugación es un proceso más rápido que la clonación, que también permite la expresión de 2 ó más genes en una sola cepa ya que al pasar algunos plásmidos de una cepa a otra se va a pasar el plásmido con el gen de la δ -endotoxina coexistiendo así en una misma cepa.

El problema que se tiene al usar el método de conjugación para producir una cepa que porté 2 plásmidos con el gen de la δ -endotoxina es que si la cepa receptora ya produce la toxina cómo podremos reconocer que la transconjugante recibió un nuevo plásmido portador del gen de la toxina ?

En este trabajo se quiso entonces establecer una estrategia para facilitar el reconocimiento de las transconjugantes y además tener una presión selectiva para asegurar que el nuevo plásmido no se pierda.

Se pensó en marcar el plásmido que codifica para la δ -endotoxina con un gen de resistencia a antibiótico. Para marcar este plásmido se proponen 2 diferentes estrategias; la primera fue introducir el plásmido pBC16, que es un plásmido transferible, pero que no tiene funciones de transferencia; por lo que al pasar de una cepa a

* Tomada de Stockdale 1980 (2).

TABLA 11

TOXICIDAD DE CEPAS DE *B. thuringiensis* CONTRA DIFERENTES
INSECTOS LEPIDOPTEROS

CEPA	<i>Spodoptera frugiperda</i>	LC 50 (g/ml) <i>Heliothis virescens</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
HD1	1092.2	18.9	50
GM7	62.1	23.2	50
GM10	59.0	19.3	50
GM2	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. Toxicidad no determinada contra insectos Lepidópteros.

otra, se pasa también el plásmido que lo transfirió y posiblemente algunos más. Las cepas de *B.t.* que se obtuvieron como portadoras del plásmido pBC16 se puede utilizar para un proceso de conjugación con otras cepas de *B.t.* El análisis de las transconjugantes Tc^r que poseen el plásmido pBC16 es laborioso ya que hay que determinar si el plásmido con el gen de la toxina también fue transferido a las transconjugantes. Como el gen de resistencia a Tetraciclina del plásmido pBC16, está contenido dentro de un transposón (Tn916), se trató de inducir la transposición con el fin de buscar cepas con el transposón integrado en el plásmido que codifica para la δ -endotoxina. Mediante experimentos de transformación de cepas de *B.t.* con el plásmido pBC16, logramos inducir la transposición del Tn916, pero al analizar las cepas resultantes, solamente obtuvimos transposición en el cromosoma (Fig.10). Teóricamente deberíamos de ser capaces de encontrar cepas de *B.t.* con el transposon Tn916 integrado también en ADN de plásmido. El hecho de que no obtuvimos cepas de este tipo se pudo deber a que no analizamos un número suficientemente grande de cepas resultantes de la transformación ó también a que existe un sitio dentro del cromosoma de *B.t.* en donde la transposición de este Tn916 sea favorecida, por lo que aún en un análisis exhaustivo de transformantes, únicamente encontraremos cepas con el Tn916 integrado en el mismo lugar. La segunda estrategia consistió en clonar el gen de la toxina junto a un gen de resistencia a antibiótico en un vehículo que no se replique en *B.t.*, de tal manera que al introducir esta construcción en *B.t.* por recombinación homóloga se integre con el gen de la toxina nativo quedando así marcado el plásmido que posee el gen que codifica para la δ -endotoxina con un gen de resistencia a antibiótico.

Para esto se utilizó el plásmido pBS42 al cual se le realizó una doble digestión con las enzimas BamHI y HincII. Se obtiene un fragmento que posee el gen de resistencia a Cloramfenicol y el origen de replicación en Gram negativos y al cual se liga el gen de la δ -endotoxina, tal y como se describió en resultados.

Al transformar con esta construcción a células de *E.coli* HB101, se obtuvieron 100 colonias Clm^r, a las cuales se les realizó hibridación en colonia usando como sonda el oligonucleótido

RB-9, el cual es homólogo a una región del gen *CryIA(b)*. De esta prueba se obtuvieron hibridizaciones con 18 colonias, a las que posteriormente se les realizó una inmunodetección en gota usando anticuerpos policlonales *CryIA(b)*, obteniéndose 5 colonias positivas que producen una proteína que cruza con el anticuerpo específico contra la proteína *CryIA(b)* (Fig 14). Esto indica que la construcción está bien hecha. Cualquiera de las 5 colonias detectadas puede ser utilizada para transformar *B.t.*, seleccionando transformantes Clm^r .

El plásmido pC1 puede ser transformado a cualquiera de las cepas de *B.t.*, el único requisito de la cepa receptora es que produzca una toxina contra lepidópteros a fin de que se pueda establecer el evento de recombinación que permita la integración del marcador.

El análisis de estas transformantes es muy fácil, solo hay que determinar que el marcador de Clm^r se encuentra en el mismo plásmido que codifica para el gen *CryI*. Posteriormente esta cepa de *B.t.* se puede utilizar en experimentos de conjugación con cualquier otra cepa de *B.t.* para producir una cepa con 2 genes de δ -endotoxina de diferentes orígenes con lo cual se llegará al objetivo final que es la construcción de una cepa de *B.t.* que porte 2 genes de δ -endotoxina de diferentes orígenes.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Alan, R. Bioinsecticides: I. *Bacillus thuringiensis*. In Adv. in Biochnol. Proc. 3. Alan R. Liss. Inc. N. Y. 273-290, (1984).
- (2) Stockdale, H. Microbial insecticides. in Ind. Chem. Biochem. and fuels. Shell Research Ltd. Sittinbourne, Kent. U. K.. cap. 46, (1980).
- (3) Khachatourians G. Production and use biological pest control agents. Trends in Biotechnol. 120-124, (1986).
- (4) Dean, H. D. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*. Biotech. and Gen. Eng. Rev. 2, 12, (1984).
- (5) Dulmage, H.T. Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* and Their Potencial for Pest Control, in Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. (Burges H.D.) Academic Press pp 193-222 (1981).
- (6) Golberg, L. J. and Margalit J.A Bacterial spore demostrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranatena unguiculata*, *Culex univattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37 355-358 (1977).
- (7) Hofte, H. Seurinck, J. Van Houtuen, A. and Vaeck M. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against coleoptera. Nucleid Acid Res. 15 7185 (1987).
- (8) De Barjac, H. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In Microbial Control of pests and Pland Diseases 1970-1980. Burges H. D. Academic Press, London. 35, (1981).
- (9) Whiteley, H. R., and Shnepf, H. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 549-576, (1986).
- (10) De Barjac, H., Frachon, E. Clasification of *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga. 35, 2: 233-240, (1990).
- (11) Hofte, H., and Whiteley, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53, 2: 242-245,

(1989).

- (12) Knowles, B. H., Thomas, W. E., and Ellard, D. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. *FEBS Letters*. 168, 2: 197-202, (1984).
- (12a) Knowles, B.H.; Ellard, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificities *Biochim. Biophys. Acta* 924: 509-518 (1987).
- (12b) George E., Schwab and Paul Culver *In Vitro Analyses of Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Action. In *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*. Leslie A. Hickie and William Fitch Ed. pp 36-45. American Chemical Society, Washington, DC (1990).
- (13) Griego M., Moffett D., and Spence D. Inhibition of active K^+ transport in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *B. thuringiensis* endotoxin *J. Insect. Physiol.* Vol. 25: 283-288 (1979).
- (14) Slatin S., Abrams C.K., Leigh E. Delta-Endotoxin Form Cation Selective Channels in planar Lipid Bilayers. *Biochemical and Biophysical Research communication* Vol. 169 2, 765-772.
- (15) Hoffmann, C., Van Rie, J. and Jansens, S. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 7844-7848, (1988).
- (16) Sacchi, U. Wolfersberger, M.G. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS* 204: 213-218 (1986).
- (17) Wolfersberger M. G. Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin of sodium or potassium gradient dependent amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles. *Arch. Insect. Biochem Physiol.* 12: 267- 277 (1989).
- (18) Gonzales, J., Dulmage, H., and Carlton, B. Correlation between specific plasmid and δ -endotoxin production in

- Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5: 351-365, (1981).
- (19) Zurkowski, W. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol* 150: 999-1007, (1982).
 - (20) Faust, R.M., Abe, K., Iizuka T., Bulla L. A.Jr., Meyers, C.L. Plasmid 9: 98-103 (1983).
 - (21) Kronstad, W., Schnepf, H. and Whiteley, R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* 154, 1: 419-428.
 - (22) Held, G.A., Bulla, L. A. Jr, E. Ferrari, Aronson A. I., Minnich A. Cloning and localization of lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6065-6069 (1982).
 - (23) Lereclus, D. et al. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences' through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.* 186: 391-398, (1982).
 - (24) Schnepf, H. and Whiteley, R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 5: 2893-2897, (1981).
 - (25) Wakibo, H., Raymond, K. and Bulla, L. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA.* 5: 305-314, (1986).
 - (26) Lereclus D. et.al. Role, Structure and Molecular organization of genes coding for the parasporal δ -endotoxin of *B.th.* *American Society for Microbiology Cap.13* 255-276. (1989).
 - (27) Aronson A., Beckman W., Dunn P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbial Reviews.* Vol 50: 1, 1-24 (1986).
 - (28) Faust, R. and Bulla, H. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Plasmid.* 9: 98-103, (1983).
 - (29) Lereclus, D., et al. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *Mol. Gen. Genet.* 191: 307-313, (1983).
 - (30) Lereclus, D. et al. A transposon-like structure related to

- the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J.* 3: 2561-2567, (1984).
- (31) Mahillon, J. et al. Nucleotide sequence and structural organization of an insertion sequence element (IS231) from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715. *EMBO J.* 4: 3895-3899, (1985).
- (32) Lereclus, D. et al. Identification of Tn 4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 52-57, (1986).
- (33) Kronstad, J. and Whiteley, H.R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.* 160: 95-102, (1984).
- (34) Mahillon, J. et al. Cloning and nucleotide sequence of different iso-IS231 elements and their structural association with the Tn 4430 transposon in *Bacillus thuringiensis*. *Gene.* 51: 187-196, (1987).
- (35) Wong, H, Schnepf, H and Whiteley, H. R. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 258: 1960-1967, (1983).
- (36) Brown, B. and Whiteley, H. R. Isolation of *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4166-4170, (1988).
- (37) Thorne, L, et al. Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Bacteriol.* 166: 801-811, (1986).
- (38) Wong, H. and Chang, S. Identification of a positive retroregulator that functions in *E. coli* and *B. subtilis*. In *Mol. Biol. of Microb. Differentiation*. American Society for Microbiology. W.D.C. 104-109, (1985).
- (39) Gonzales, J. Brown B.S. and B.C. Carlton. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B.cereus* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6951-6955.
- (40) Klier, A., C. Bourgouin, and Rapaport G. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. *Mol. Gen. Genet.* 191: 257-262 (1983).

- (41) Fisher, H., Lüthy, P., and Schweitzer, S. Introduction of plasmid pC194 into *Bacillus thuringiensis* by protoplast transformation and plasmid transfer. *Arch. Microbiol.* 139: 213-217, (1984).
- (42) Chang, S. and Cohen, V. High frequency of transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115, (1979).
- (43) Mahillon J. et al. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by Electroporation. *FEMS Microbiology Letters* 60: 205-210 (1989).
- (44) Rigby, P. W., Dickmann M, Rhodes C. and Berg P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251 (1977).
- (45) Kronstad, J. and Whiteley H. R. Tree class of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *GENE* 43: 29-40 (1986).
- (46) Lecadet, A., Blunde, S., Ribier, W. J. *Gen. Microb.* 121: 203-212 (1980).
- (47) Heierson, A., Landen, R., Lögren, A., Dalhammar, G., Boman, H. J. *Bact.* 169: 1147-1152 (1987).
- (48) Kronstad J. W., Schnep H. E., and Whiteley H.R. *J. Bacteriology* 154: 419-428 (1983).
- (49) Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., *Fed. Proc.* 35: 2037-2043 (1976).
- (50) Maniatis t., Fritsh f., Sambrook J., *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* Cold Spring harbor Laboratory. (1989).
- (51) Thomas W.E. and Ellar D.J. *J. Cell. Sci.* 60: 181- 197 (1983).
- (52) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, Lond.* 227: 680-685 (1970).
- (53) Perbal Bernard. *A Practical Guide To Molecular Cloning* Second Edt. John Wiley & Sons. (1988).
- (54) Saz-Fall. *Microbial Genetics Laboratory Notes.* Bio. Sci. 487 (1988)
- (55) Battisti L., Green B., Thorne B.,C., Mating System For Transfer of plasmid Among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*

and *Bacillus thuringiensis*. J. of Bacteriology 162, 2: 543-550
(1985).

ABREVIATURAS

B.t. *Bacillus thuringiensis*
DNA.....Acido desoxiribonucleico
RNA.....Acido ribonucleico
PBS.....Buffer fosfato, sales
Amp.....Ampicilina
Tc.....Tetraciclina
Km.....Kanamicina
Clm.....Clorafenicol
Erm.....Eritromicina
Sm.....Streptomicina
Rif.....Rifampicina
rpm.....revoluciones por minuto