

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE DETERMINAN LA  
ESPECIFICIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE  
*Bacillus thuringiensis***

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA EL:**

**M.C. ZACARIAS JIMENEZ SALAS**

**MONTERREY, N. L., MEXICO**

**DICIEMBRE DE 1997**

TD  
SB95  
.54  
J5  
c.1



1080080857

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE DETERMINAN LA  
ESPECIFICIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE  
*Bacillus thuringiensis***

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA EL:**

✶

**M.C. ZACARIAS JIMENEZ SALAS**

TD  
SE951.54  
J5



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE DETERMINAN LA  
ESPECIFICIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. C. ZACARIAS JIMÉNEZ SALAS**

**APROBADA  
COMISION DE TESIS**



---

**DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ**  
**DIRECTOR**



---

**DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO**  
**ASESOR**



---

**DR. LUIS J. GALÁN WONG**  
**ASESOR**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE DETERMINAN LA  
ESPECIFICIDAD DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. C. ZACARIAS JIMÉNEZ SALAS**

**COMISION DE EXÁMEN**

**Dr Benito Pereyra Alférez  
Presidente**

**Dra. Lilia H. Morales Ramos  
Secretario**

**Dr. José Santos Alvarado G  
Vocal**

**Dr Luis J Galán Wong  
Vocal**

**Dr. Carlos Hernández Luna  
Vocal**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA U.A.N.L. BAJO LA DIRECCION DEL DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ.**



# INDICE

	<b>Página</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>i</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>Indice de Figuras y Tablas</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>5</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>6</b>
1 - <i>Bacillus thuringiensis</i> en el control biológico	6
2 - Clasificación de las toxinas Cry	7
3 - Organización génica y expresión de los genes <i>cry</i>	12
4 - Organización proteica de las $\delta$ -endotoxinas	14
5 - Estructura tridimensional de las toxinas Cry	14
6 - Modo de acción	17
7 - Relación estructura-función	20
<b>Material y Métodos</b>	<b>23</b>
Origen de los gens de las $\delta$ -endotoxinas, hospederos y vectores	23
I. Identificación de los dominios	24
II. Delimitación de los dominios	24
III. Subclonación de los genes nativos	27
IV. Intercambio del dominio II	30
V. Intercambio de los dominios I y III	31
VI. Producción de las toxinas quiméricas	31
VII. Bioensayos	32
<b>Resultados</b>	<b>33</b>
I. Identificación de los tres dominios Cry1Aa y Cry1Ac por comparación y alineamiento de su secuencia de aminoácidos con Cry3A	33
II. Delimitación de los tres dominios en ambos genes, introduciendo sitios de restricción únicos mediante mutagénesis sitio-dirigida, con la finalidad de subclonarlos independientemente	34

III Subclonación de los dominios en <i>E. coli</i> para reconstruir los genes <i>cryIAa</i> y <i>cryIAc</i>	35
IV Intercambios recíprocos del dominio II entre <i>cryIAa</i> y <i>cryIAc</i> , para construir genes quiméricos	37
V Intercambio de los dominios I y III	39
VI Análisis de la expresión de los genes reconstruidos	39
VII. Actividad biológica	40
<b>Discusión</b>	<b>42</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>50</b>
<b>Apéndices</b>	<b>63</b>
A Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas estudiadas	64
B Estabilidad y fuerza de apareamiento de los oligonucleótidos diseñados	69
C Amplificaciones teóricas de los genes <i>cryIAa</i> y <i>cryIAc</i> con los oligos diseñados	73
D Transformación de <i>E. coli</i> por el método químico con CaCl <sub>2</sub>	76
E Extracción de plásmidos a pequeña escala	78
F Purificación de plásmidos	79
G Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación (electrotransformación)	80
H Extracción de plásmidos a gran escala	82
I Purificación de plásmidos por columna	83
J. Electroforesis e inmunodetección de proteínas	84
K. Medios de cultivo y soluciones	86

## DEDICATORIA

### **A mi familia:**

Sra. Elvira Pérez de Jiménez

Niños: Jessica Yazmin

Gabriela Deyanira

Miguel Zacarias

Erica Alejandra

Porque, aunque no lo sepan, ustedes son el motivo que me impulsa a seguir adelante. Gracias por su amor, comprensión y paciencia.

### **A mis padres:**

Sr. Zacarias Jiménez Guajardo

Sra. María del Refugio Salas de Jiménez

Porque de ustedes siempre he recibido amor, apoyo y aliento, cada meta de mi vida se la debo a ustedes, gracias por su amor incondicional

### **A mis hermanas:**

Dra. Sanjuana de la Paz

Lic. María Antonieta

Por el cariño fraternal que nos une Gracias por el apoyo recibido, aún en los momentos más difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Al Depto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por darme la oportunidad para realizar ahí mis estudios doctorales

A las Autoridades de la Preparatoria No 23 de la UANL, en particular al Director QBP J. Hermilo Lara Treviño, por las facilidades otorgadas para que se pudiera cumplir esta meta de mi realización profesional

Al Dr. Benito Pereyra Alferez, Director de esta tesis, por la oportunidad brindada y por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo, pero principalmente por su amistad. Gracias por ser parte de mi formación académica

A los integrantes de mi comité de tesis: Dr. Benito Pereyra A., Dra. Lilia H. Morales R., Dr. Luis J. Galán Wong, Dr. José Santos García A. y Dr. Carlos Hernández L., por la revisión y discusión de esta tesis

Al QBP Luis Castulo Damas Buenrostro, QBP Roberto Carlos Vazquez Juárez y M.C. María Magdalena Iracheta Cardenas, por la amistad surgida durante el desarrollo de este trabajo que, sabemos, es el fruto de un gran esfuerzo compartido

A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos, Alberto, Erasmo, Ernesto, Ismael, Ivette y Myriam, por su amistad y colaboración brindadas durante el desarrollo de este trabajo

Al CONACyT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios y por el apoyo económico de este trabajo (proyecto 3034N)

A todas y cada una de las personas que de una forma u otra colaboraron para la realización de este trabajo

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grado Celsius
cm	Centimetro (s)
dNTP's	Mezcla de Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
<i>et al</i>	y otros
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
kDa	Kilodaltones
kpb	Kilopares de bases
kV	Kilovoltios
l	Litro
lb/pulg <sup>2</sup>	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
mA	Miliamperes
mg	Miligramo (s)
μF	Microfaradios
μg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
μl	Microlitro (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milimetro (s)
ng	Nanogramo (s)
nt	Nucleótido (s)
Ω	Ohms
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
seg	Segundo
subsp	Subespecie
U	Unidades de actividad enzimática
V	Voltios
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Representación esquemática de los bloques conservados dentro de la familia de proteínas Cry	15
2	Estructura tridimensional de Cry3A	16
3	Estrategia para subclonar el dominio tóxico de Cry1Aa y Cry1Ac	27
4	Clonación del dominio I en <i>E. coli</i>	28
5	Reconstrucción de los gens nativos delimitados con sitios de restricción	29
6	Intercambio del dominio II entre los genes <i>cry1Aa</i> y <i>cry1Ac</i>	30
7	Delimitación de cada uno de los dominios de las proteínas Cry1A por comparación con los de Cry3A	33
8	Productos amplificados de los genes <i>cry1Aa</i> y <i>cry1Ac</i> mediante PCR	35
9	Construcción y clonación del dominio I de <i>cry1Aa</i>	36
10	Análisis de restricción de los genes nativos subclonados	37
11	Análisis de restricción del plásmido pAC2	38
12	Análisis de restricción del plásmido pCA2	38
13	Construcciones genéticas resultantes	39
14	Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de las proteínas de extractos totales de <i>E. coli</i> recombinantes	40

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Clasificación de las $\delta$ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2	Dominios de especificidad de las proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
3	Cepas bacterianas y plásmidos	23
4	Características de los plásmidos recombinantes construidos y toxinas resultantes	40
5	Actividad insecticida de las toxinas quiméricas diseñadas contra <i>Trichoplusia ni</i>	41

## RESUMEN

Las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* son proteínas insecticidas formadas por tres dominios estructurales a los cuales se atribuyeron funciones específicas. el dominio I parece ser el responsable de la formación de poros en la membrana de las células epiteliales del intestino medio, el dominio II podría estar implicado en la especificidad y el dominio III parece participar en la integridad estructural de la proteína. Sin embargo, tales funciones no han sido completamente demostradas. El propósito de este trabajo fue determinar el papel de cada dominio realizando intercambios homólogos entre las toxinas CryIAa y CryIAc. Para lograr lo anterior se definieron y subclonaron las regiones génicas que codifican para dos toxinas altamente homólogas pero con diferente espectro insecticida y se probó el efecto del reemplazo de los dominios en la actividad biológica. Los dominios estructurales se delimitaron de la siguiente manera: dominio I, *Pst*I-*Bam*HI; dominio II, *Bam*HI-*Bgl*II y el dominio III con *Bgl*II y *Kpn*I. Los sitios de restricción y fusión de los dominios se realizó por PCR. Para la introducción del sitio para *Bam*HI fue necesario introducir el codón GGA (glicina) en la posición 252 de ambos genes. De esta manera, clonamos la fracción tóxica de ambas toxinas. Se obtuvieron los genes que codifican para las toxinas truncadas CCC (CryIAc con los dominios delimitados) y AAA (CryIAa); posteriormente se realizaron intercambios de los dominios y se obtuvieron las proteínas quiméricas CAC (CryIAc con el dominio II de CryIAa), ACA (CryIAa con el dominio II de CryIAc), CAA (CryIAa con el dominio I de CryIAc) y CCA (CryIAc con el dominio III de CryIAa). La actividad biológica de las proteínas obtenidas se probó utilizando larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. Los resultados de las toxinas reconstruidas y quiméricas observándose que CCC es más tóxica que AAA, con un 61.1% y 20.8% de mortalidad, respectivamente. Por otra parte, no se observaron variaciones en la actividad biológica de las quimeras con los dominios I o III intercambiados, con una mortalidad del 22% para CAA y 54.2% con CCA con respecto a las toxinas paternas. Al intercambiar el dominio II se encontró que CAC disminuye su actividad biológica comparada con su proteína paterna (30.5%) y ACA (40.4%) la incrementa. Estos resultados indican que el dominio II de CryIAa posee mayor afinidad que el dominio II de CryIAc.

## ABSTRACT

The  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* are insecticidal crystal proteins formed by three structural domains, which display the putative biological functions. domain I, could be involved in the cell lysis forming pores in the membrane of midgut epithelial-cells; domain II recognize the receptor, given the specificity and the domain III could be implicated in structural protection. However, their specific roles has not been demonstrated. The goal of this study was to know the specific role of each domain means homologous domain-exchanges between CryIAa and CryIAc toxins. In order to it we cloned the DNA region encoding each domain by introducing restriction sites. The domains were delimited as follow domain I *Pst*I-*Bam*HI, domain II, *Bam*HI-*Bgl*II and domain III with *Bgl*II y *Kpn*I. This sites were introduced by PCR technology. The design the *Bam*HI site was necessary to introduce the GGA codon (glycine) at 252 position in both genes. So we cloned the toxic fragment of CryIAa and CryIAc. We obtained both truncated toxins CCC (CryIAc) and AAA (CryIAa). After that we done homologous domain-exchanges obtaining the chimeric toxins CAC (CryIAc with domain II from CryIAa), ACA (CryIAa with domain II from CryIAc), CAA (CryIAa with domain I from CryIAc) and CCA (CryIAc with domain III from CryIAa). The chimeric toxins activity was tested using neonate larvae of *Trichoplusia ni*. The results showed that CCC killed 61.1% whereas AAA only 20.8%. In the other hand, we do not observed significatives changes with chimeric toxins CAA neither CCA (mortality of 22% and 54.2%, respectively) respected its parental toxins. With domain II interchanged we found CAC reduced its biological activity compared with paternal protein and ACA was increased (40.4%).



## INTRODUCCION

Las  $\delta$ -endotoxinas son una familia de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis* durante la fase de esporulación. Estas toxinas son activas contra una amplia variedad de insectos de importancia agrícola y médica así como a otros invertebrados (Bravo 1997). Ya que estas proteínas son altamente específicas y no ocasionan alteraciones al medio ambiente son una valiosa alternativa contra el uso de insecticidas químicos para el control de insectos.

Para comprender la especificidad de estas toxinas es necesario conocer su modo de acción a nivel molecular. El grupo CryIA son endotoxinas activas contra larvas de lepidópteros y constituyen el grupo de proteínas Cry mejor estudiado. Después de ser ingeridas por el insecto blanco, las toxinas son solubilizadas debido a las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto, se procesadas a toxina activa por las proteasas intestinales, la toxina se une a receptores específicos en el intestino medio, y se inserta en la membrana de las células epiteliales del intestino formando canales (Knowles y Ellar 1987). Esta provoca lisis celular y la perforación del intestino que conducen a la parálisis y muerte del insecto (Bravo *et al.* 1992).

Algunos grupos de investigación han concentrado sus esfuerzos para definir las regiones que determinan la especificidad de las toxinas CryIAa y CryIAc. Mediante intercambios recíprocos de secuencias en las regiones divergentes entre toxinas de diferentes especificidades produjeron híbridos activos con especificidades alteradas. De esta forma encontraron que la región importante para la especificidad hacia *Bombyx mori* en CryIAa se localiza entre los residuos 332-450 (Ge *et al.*, 1989), en CryIAc las regiones que dan la especificidad hacia *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* se localizan en los segmentos 332-450 y 332-612, respectivamente (Ge *et al.*, 1991).

Recientemente, Li y col. (1991) describieron la estructura tridimensional de la toxina Cry3A, una  $\delta$ -endotoxina activa contra coleópteros y propusieron tres dominios funcionales en la

toxina madura el dominio I, contiene 7  $\alpha$ -hélices, está involucrado en la formación de poro; el dominio II, contiene 3 láminas  $\beta$ -plegadas participa en la unión específica al receptor en el intestino del insecto blanco, y; el dominio III contiene también láminas  $\beta$ , podría estar involucrado en proteger a la toxina madura contra las proteasas del intestino medio.

Al asociar los resultados obtenidos de modificaciones de genes con la estructura de la toxina se observa que los intercambios utilizados para analizar la actividad insecticida, son muy grandes y no corresponden a un dominio en particular, lo que impide relacionar una función específica a un dominio determinado. Por lo anterior, se considera de gran interés, analizar el papel de cada dominio en la actividad insecticida y en particular la participación del dominio II íntegro sobre la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas. Sin duda, el uso de proteínas quiméricas obtenidas mediante intercambios de dominios íntegros entre toxinas con actividad biológica diferente, será de gran ayuda en la determinación de la función de cada dominio estructural, lo que permitirá, en un futuro, diseñar toxinas quiméricas más potentes y/o con mayor espectro insecticida.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las  $\delta$ -endotoxinas están constituidas por tres dominios de los cuales al dominio II se le atribuye el papel de especificidad. Sin embargo, esta suposición se apoya en trabajos donde se incluyen regiones de aminoácidos muy extensas, que incluyen al dominio II y parte del dominio III. Sería interesante determinar si en realidad el dominio II *per se* es el único involucrado en la especificidad insecticida, en base a lo anterior se sugiere la siguiente hipótesis:

**La especificidad hacia el insecto blanco, es determinada por el dominio II que integra la  $\delta$ -endotoxina.**

Para demostrar lo anterior se propuso como objetivo general determinar la participación del dominio II en el espectro de actividad insecticida. Las proteínas que se utilizaron fueron CryIAa y CryIAc ya que poseen más del 85% de homología y tienen diferente grado de toxicidad contra *Trichoplusia ni*; por esta razón fueron seleccionadas para intercambiar el dominio II y estudiar el espectro de actividad insecticida de las quimeras formadas. Adicionalmente, también se intercambiaron los dominios II y III y se analizaron de la misma forma.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar los tres dominios en CryIAa y CryIAc por comparación y alineamiento de su secuencia de aminoácidos con Cry3A.
- 2.- Delimitar los tres dominios en ambos genes, introduciendo sitios de restricción únicos, mediante mutagénesis sitio-dirigida, con la finalidad de subclonarlos independientemente.
- 3.- Subclonar los dominios en *Escherichia coli* para reconstruir los genes *cryIAa* y *cryIAc*.
- 4.- Realizar intercambios recíprocos del dominio II entre ambos genes (*cryIAa* y *cryIAc*), para construir proteínas quiméricas.
- 5.- Realizar el intercambio de los dominios I y III entre las construcciones génicas construidas.
- 6.- Producir las toxinas quiméricas en *E. coli*.
- 7.- Analizar la actividad biológica de las toxinas diseñadas.

## ANTECEDENTES

### 1.1 *Bacillus thuringiensis* en el control biológico

Desde que el hombre se volvió sedentario gracias al desarrollo de la agricultura, ha tenido que contender con plagas que atacan y destruyen sus cultivos, estimándose que las pérdidas de más de la tercera parte de los cultivos en la etapa de pre cosecha se debe al ataque de insectos (Perlak *et al.*, 1990). En las últimas décadas, el uso extensivo de insecticidas químicos sintéticos ha traído graves consecuencias en términos de contaminación ambiental y en la aparición de resistencia. Por este motivo, surge gran interés en la búsqueda de estrategias en el manejo de plagas. Una alternativa es el uso de agentes biológicos para el control de plagas, basados en el uso de patógenos (bacterias, virus y hongos) y entomófagos. Las ventajas de estos agentes de control biológico incluyen su fácil descomposición en el medio ambiente, alta selectividad hacia el organismo blanco, y baja probabilidad de desarrollo de resistencia. Por control biológico se entiende el uso de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o productos génicos para reducir el efecto de organismos indeseables en favor del organismo benéfico (Gabriel y Cook, 1990). Entre los agentes biológicos, los más ampliamente utilizados son formulaciones en base a *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Aronson, 1986). En 1990, las ventas anuales de los productos basados en Bt sumaron aproximadamente 100 millones de dólares, que constituyen del 90 al 95% de las ventas mundiales de todos los productos de control biológico de plagas (Rigby, 1991).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria de suelo Gram positiva que se caracteriza porque produce inclusiones cristalinas de naturaleza proteica durante la fase de esporulación (Aronson, 1986). Estos cristales consisten de proteínas, llamadas  $\delta$ -endotoxinas, que tienen una actividad insecticida altamente específica contra larvas de lepidópteros (Höfte *et al.*, 1988), coleópteros (Hermstadt *et al.*, 1987), dípteros, (Donovan, *et al.*, 1988b) y más recientemente se ha descrito contra nemátodos y protozoarios, entre otros (Feithelson, 1992).

Hasta 1990, se conocían más de 45 variedades de Bt que se diferencian en base a sus antígenos flagelares, así como 13 subgrupos que dan un total de 58 serovariedades (De Bajac y Frachon, 1990). El cristal de Bt puede estar constituido por uno o más diferentes tipos de

proteínas (Haider *et al.*, 1990), como en el caso de Bt aizawai 7.29 que esta formado por al menos 5 tipos de  $\delta$ -endotoxinas (Lecadet *et al.*, 1988).

Los insecticidas comerciales de Bt se basan en cepas y aislados nativos no modificados. Los avances recientes en la tecnología del DNA recombinante hacen ahora mas factible utilizar Bt en el control de plagas, esta tecnología permite clonar genes de las proteínas insecticidas y expresarlos en hospederos heterólogos, por lo tanto se proporcionan nuevos sistemas de producción y distribución para estas proteínas. Además, las técnicas de ingeniería genética han facilitado el estudio de la relación estructura-función. Estas tecnologías también ofrecen una ventaja para desarrollar cepas de Bt con actividades incrementadas y mayor espectro de acción.

## 1.2 Clasificación de las toxinas Cry

Desde 1981 a la fecha, se han descrito numerosas proteínas del cristal insecticida, clonado los genes que codifican para estas proteínas y publicado las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de alrededor de 50 de ellas (Schnepf y Whiteley, 1981; Feitelson *et al.*, 1992). Sin embargo, muchas de estas secuencias son idénticas o muy parecidas y se cree que representan al mismo gen o ligeras variaciones de este. En base a la homología en su secuencia de aminoácidos y de su espectro de actividad insecticida, Höfte y Witheley (1989) las agruparon en una familia de proteínas denominadas Cry y las dividieron en varias clases: CryI si son específicas contra lepidópteros, Cry II si atacan lepidópteros y dípteros, Cry III si matan coleópteros y Cry IV si son específicas contra dípteros. Posteriormente, se puso de manifiesto la necesidad de diseñar un nuevo sistema de clasificación, ya que observaron inconsistencias y confusiones con este sistema, por ejemplo, varios genes con diferente homología y actividad insecticida se denominaron CryV (Tailor *et al.*, 1992; Payne *et al.*, 1992).

Recientemente, se propuso un nuevo sistema de clasificación, basado únicamente en la similitud en la secuencia de aminoácidos deducida (Crickmore, *et al.*, 1995). Se consideró como un gen *cry* a todo aquel gen de Bt que codifique para una proteína paraesporal y que exhiba actividad plaguicida o algún efecto tóxico verificable experimentalmente hacia algún organismo

blanco o bien que tenga una notable similitud de secuencia con las proteínas Cry conocidas. En esta clasificación solo se consideran aquellas secuencias presentes en algún banco de datos (GeneBank, EMBL, o PIR).

Para asignar el nuevo nombre a cada gen *cry* se procedió de la siguiente manera. Utilizando el programa Clustal W, se alinearon las secuencias deducidas de aminoácidos de las proteínas completas y se calculó el porcentaje de identidad entre cada par de toxinas; después se diseñó un árbol filogenético y se establecieron límites de porcentaje de identidad para definir cuatro niveles o categorías. De esta manera cada toxina tiene un nombre único que incorpora estos rangos. El primer nivel es un número arábigo, que sustituye al romano usado anteriormente (por ejemplo, Cry1 en vez de CryI), este nivel representa el 46% de similitud. El segundo nivel es una letra mayúscula (por ejemplo Cry1A, Cry1B, etc.), este nivel representa el 78% de semejanza. El tercer nivel corresponde al 46% de similitud y se representa con una letra minúscula (por ejemplo Cry1Aa, Cry1Ab, etc.). El último nivel indica el orden cronológico de publicación de cada secuencia y se indica con un número arábigo (por ejemplo Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.).

En la Tabla 1 se muestra la lista más reciente de proteínas Cry, ahí se indica el nombre actual, el nombre anterior y el número de acceso al GeneBank de cada una de las toxinas. Cabe indicar, que para introducir una nueva secuencia en esta familia, ésta deberá enviarse a alguno de los bancos de datos y además al comité asesor del Bacillus Genetic Stock Center o BGSC (Bt Cry Gene Nomenclature Committee) para ser analizadas de la manera que ya se describió anteriormente y asignarles el nombre adecuado.

#### Clase Cry1.

Son las  $\delta$ -endotoxinas más comunes en los serotipos de Bt. Generalmente se producen como protoxinas de 130–140 kDa en forma de cristales bipiramidales. La mayoría son activas contra lepidópteros, aunque algunas son tóxicas también a dípteros (Haider y Ellar, 1988) o coleópteros (Tailor *et al.*, 1992). También se ha descrito la toxina Cry1Ba activa contra lepidópteros, coleópteros y áfidos (Brizzard y Whiteley, 1988).

Tabla 1. Clasificación de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*<sup>a</sup>

Nombre actual	Nombre anterior	Rango de hospedero <sup>b</sup>	Nombre actual	Nombre anterior	Rango de hospedero <sup>b</sup>
Cry1Aa	CryIA(a)	L	Cry3C	CryIIID	C
Cry1Ab	CryIA(b)	L	Cry4A	CryIVA	D
Cry1Ac	CryIA(c)	L	Cry4B	CryIVB	D
Cry1Ad	CryIA(d)	L	Cry5Aa	CryVA(a)	N
Cry1Ae	CryIA(e)	L	Cry5Ab	CryVA(b)	N
Cry1Ba	CryIB	L	Cry6A	CryVIA	N
Cry1Bb	ET5	L	Cry6B	CryVIB	N
Cry1Bc	CryIB(c)	L	Cry7Aa	CryIIC	L
Cry1Ca	CryIC	L	Cry7Ab	CryIIICb	C
Cry1Cb	CryIC(b)	L	Cry8A	CryIIIE	C
Cry1Da	CryID	L	Cry8B	CryIIIG	C
Cry1Db	PrtB	L	Cry8C	CryIIIF	C
Cry1Ea	CryIE	L	Cry9A	CryIG	L
Cry1Eb	CryIE(b)	L	Cry9B	CryIX	L
Cry1Fa	CryIF	L	Cry9C	CryIH	L
Cry1Fb	PrtD	L	Cry9D	NI41	N.D.
Cry1Ga	PrtA	L	Cry10A	CryIVC	D
Cry1Gb	CryH2	L	Cry11A	CryIVD	D
Cry1Ha	PrtC	D	Cry11B	Jeg80	D
Cry1Ia	CryV	L	Cry12A	CryVB	N
Cry1Ib	CryV	L	Cry13A	CryVC	N
Cry1Ja	ET4	N.D.	Cry14A	CryVD	N
Cry1Ka	CryI	N.D.	Cry15A	34kDa	L
Cry2Aa	CryIIA	L/C	Cry16A	cbn31	N.D.
Cry2Ab	CryIIB	L	Cry17A	cbn72	N.D.
Cry2Ac	CryIIC	L	Cry18A	CryBP1	N.D.
Cry3A	CryIIIA	C	Cyt1Aa	CytA	Citolíticas
Cry3Ba	CryIIIB	C	Cyt1Ab	CytM	Citolíticas
Cry3Bb	CryIIIB2	C	Cyt2A	CytB	Citolíticas

<sup>a</sup>Adaptada de Crickmore *et al.*, 1995. <sup>b</sup>L: Lepidópteros, C: Coleópteros, D: Dípteros, N: Nemátodos, N.D.: No determinado.

### Clase Cry2.

Se producen como protoxinas de 70 kDa que se acumulan en cristales cuboidales. El fragmento tóxico es de 50 a 60 kDa. Los holotipos que se conocen son Cry2A activa contra lepidópteros y dípteros (Donovan *et al.*, 1988a), Cry2Ab y Cry2Ac activas solamente contra lepidópteros (Widner y Whiteley, 1989).

### Clase Cry3.

Las proteínas que pertenecen a esta clase son activas contra coleópteros; Se producen como protoxinas de entre 70 y 75 kDa formando cristales romboidales. Son procesadas a toxinas de alrededor de 66 kDa (Herrnstadt *et al.*, 1987; Donovan *et al.*, 1988b).

### Clase Cry4.

Estas toxinas son activas contra dípteros. Esta formada por dos holotipos, las proteínas Cry4Aa y Cry4Ba de 135 y 128 kDa, respectivamente (Ward y Ellar, 1987; Chungjatupornchai *et al.*, 1988). Los fragmentos procesados proteolíticamente generan péptidos de 50 y 70 kDa. son comunes en el serotipo *israelensis*.

### Clase Cry5.

Este grupo esta formado por tres holotipos. Las toxinas Cry5Aa y Cry5Ab pesan 152.3 y 141.8 kDa, respectivamente y son activas contra nemátodos y ácaros ( Edwards *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1992); la toxina Cry5Ba pesa 140 kDa y es activa contra coleópteros (Foncerrada y Narva, 1995).

### Clase Cry6

Solamente dos holotipos forman esta clase Cry6Aa de 54 kDa y Cry6Ba de 44 kDa; ambas son activas contra nemátodos y ácaros (Edwards *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1992). Estas proteínas se forman como cristales que permanecen unidos a las esporas después de la citólisis de la bacteria.

### Clase Cry7.

Estas toxinas se producen como protoxinas de 130 kDa que forman cristales bipiramidales que son procesados a productos de 66 kDa aproximadamente; esta clase anteriormente era llamada CryIIIC y son activas contra coleópteros (Höfte *et al.*, 1992).



#### Clase Cry8.

Son protoxinas que pesan entre 130 y 140 kDa. Están formada por tres holotipos que anteriormente se agruparon en la clase CryIII por ser activas contra coleópteros; Cry8Aa también es activa contra ácaros (Narva y Fu, 1994; Payne *et al.*, 1992).

#### Clase Cry9.

Esta clase está formada por tres holotipos: Cry9Aa (antes CryIG), Cry9Ba (antes Cry X) y Cry9Ca (antes CryIH). Son protoxinas de 126-130 kDa. La primera y la tercera activas contra lepidópteros (Smulevitch *et al.*, 1991), se desconoce el blanco de Cry9Ba (Shevelev *et al.*, 1993).

#### Clase Cry10.

En esta clase solamente se encuentra la toxina que anteriormente se llamaba CryIVC. Es una protoxina de 78 kDa que se procesa a un fragmento de 58 kDa (Thorne *et al.*, 1986); es activa contra dípteros y fue aislada del serotipo *israelensis*.

#### Clase Cry11.

Formada por dos holotipos Cry11Aa que es una protoxina de 72 kDa que rinde una toxina de 30 kDa y Cry11Ba que pesa 80 kDa ambas toxinas son activas contra dípteros (Donovan *et al.*, 1988c; Kawalec *et al.*, 1995)

#### Clase Cry12.

Integrada por un solo elemento anteriormente denominado CryVB. Es una proteína de 142 kDa activa contra nemátodos y ácaros (Narva *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1992c).

#### Clase Cry13.

La toxina conocida hasta ahora como CryVC es el único miembro de esta clase. Es una proteína de 88 kDa que actúa contra nemátodos (Narva *et al.*, 1991).

### Clase Cry14

En esta clase sólo se encuentra la toxina que anteriormente se conocía como CryVD. Esta toxina pesa 72 kDa y es activa contra dípteros y coleópteros (Donovan *et al.*, 1988a; Payne y Narva, 1994).

### Clase Cry15

Incluye solamente una proteína de 34 kDa, aislada del serotipo *thompsoni*. La estructura primaria de esta proteína difiere mucho de las toxinas de Bt conocidas a la fecha, pero es activa contra *Manihota sexta* (Brown y Whiteley, 1992).

Existen además, una serie de toxinas paraesporales que produce Bt y que son tóxicas hacia una gran variedad de organismos, sin embargo, las secuencias que corresponden a estas proteínas no han sido depositadas en ninguno de los bancos de datos y no pueden ser incluidas en esta clasificación. Otra proteína que produce Bt presenta actividad contra organismos evolutivamente muy diferentes a los insectos, es una proteína de 133 kDa que es activa contra protozoarios (Thompson y Gaertner, 1991).

### 1.3 Organización génica y expresión de los genes *cry*

La síntesis de la mayoría de las  $\delta$ -endotoxinas en Bt tiene características muy peculiares: es dependiente de la fase de esporulación y es muy eficiente (del 20 al 30% del peso seco de las células esporuladas). Esto convierte a los genes *cry* en un sistema muy interesante para la investigación de la regulación genética en bacterias Gram-positivas. Entre los mecanismos que participan en la síntesis se encuentran el uso de factores sigma especiales, la estabilidad del RNA mensajero, el número de copias del plásmido donde reside el gen, etc. (Brown, 1993; Agaisse y Lereclus, 1995).

De los factores involucrados en la síntesis de las  $\delta$ -endotoxinas, el más interesante es la regulación de la expresión debido al uso de factores sigma especiales. Las células de Bt comienzan a sintetizar las proteínas del cristal insecticida durante la fase II hasta la fase VI de

esporulación a unas tasas de producción que finalizan alrededor del 30% del peso seco de la bacteria. El mayor conocimiento de la región del promotor del inicio de la transcripción se debe al estudio del gen *cryIAa*; este gen es transcrito de dos diferentes sitios de inicio, separados por 16 pb, Bt I y Bt II. El promotor Bt I es activado en los primeros estadios de esporulación ( $t_1$  y  $t_2$ ), mientras que Bt II se activa en la fase media a la tardía ( $t_3$ - $t_6$ ) (Wong *et al.*, 1983). Estudios de transcripción *in vitro* demostraron que el sitio Bt I depende de  $\sigma^{35}$  (Brown y Whiteley, 1988), mientras que el sitio Bt II se transcribe usando  $\sigma^{28}$  (Brown y Whiteley, 1990). Otros genes que se transcriben de esta forma son los anteriormente llamados *cryI*, *cryIIA* y *cryIVA* (Pereyra-Alferez, 1996). Los genes que codifican para  $\sigma^1$  v  $\sigma^{28}$  fueron clonados y determinada la secuencia nucleotídica, demostrándose que poseen 88 y 85% de homología con los factores sigma específicos de esporulación  $\sigma^1$  y  $\sigma^k$  de *B. subtilis*, respectivamente (Adams *et al.*, 1991).

En contraste a los genes anteriormente indicados, el gen *cry3A* de Bt subsp. *tenebrionis*, es expresado desde la fase vegetativa y es regulado durante la fase estacionaria y de esporulación (Sekar *et al.*, 1987). Este gen tiene promotores reconocidos por una forma de RNA polimerasa  $E\sigma^A$  que en *B. subtilis* expresa genes en fase vegetativa (Agaisse y Lereclus, 1994). El promotor de *Cry3A* se expresa débil pero significativamente, durante la fase vegetativa, es activado al final de la fase exponencial y permanece activo solamente hasta  $t_8$ . A diferencia de Bt I y Bt II, el promotor de *Cry3* no depende de los factores sigma específicos de esporulación.

Los altos niveles de expresión de los genes que codifican para las  $\delta$ -endotoxinas también se han correlacionado con la alta estabilidad del RNA mensajero (Wong y Chang, 1986), misma que puede ser determinada por la estructura del terminador transcripcional (Emory *et al.*, 1992). En el caso del gen *cryIAa* se demostró que el terminador transcripcional actúa como un retrorregulador positivo e incrementa la estabilidad del RNA mensajero (Wong y Chang, 1986).

De esta forma, parece que Bt ha desarrollado diferentes mecanismos implicados en la producción masiva de las proteínas del cristal. Estas estrategias diversas utilizadas por Bt constituyen un buen ejemplo de evolución bacteriana.

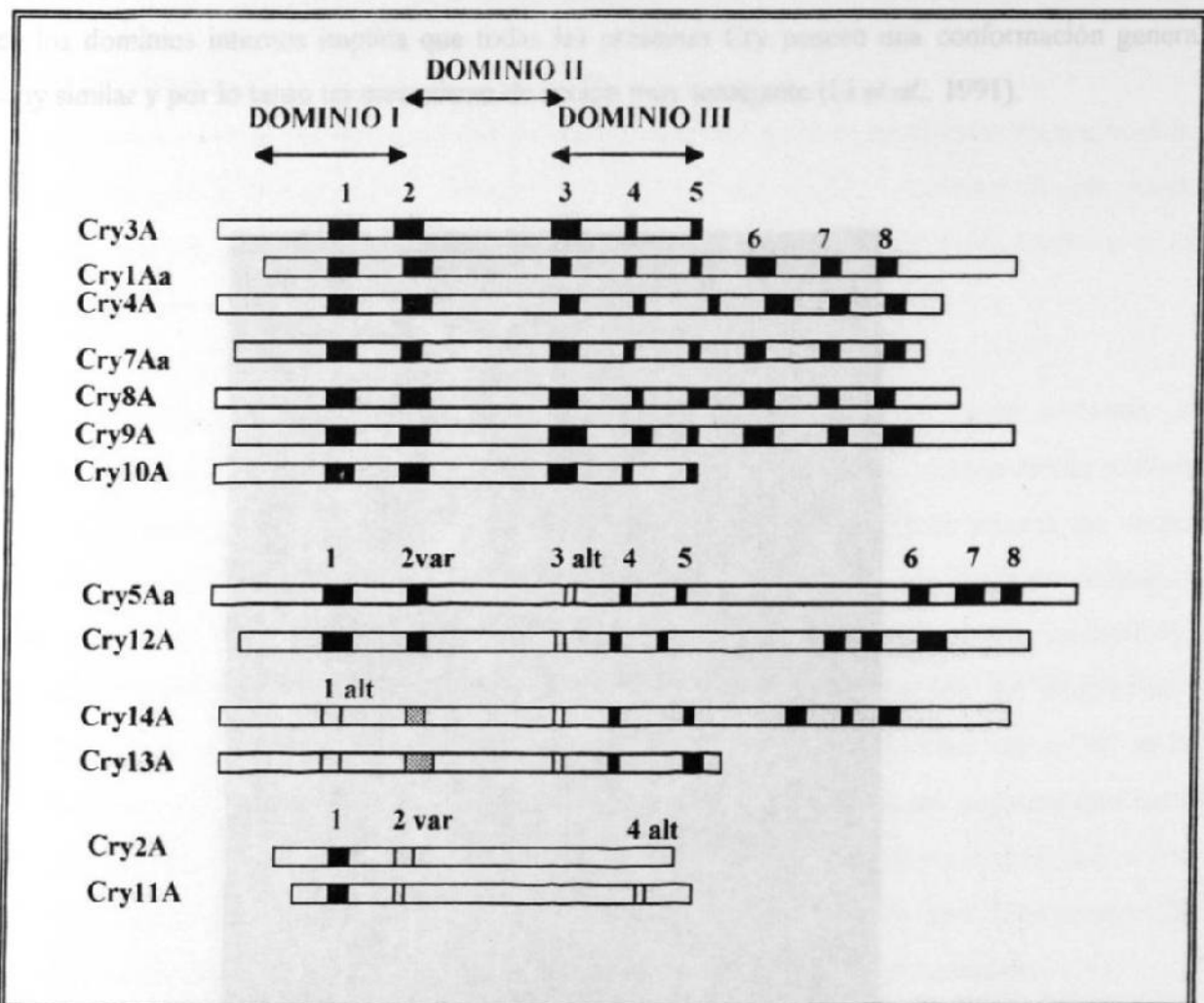
#### 1.4. Organización proteica de las $\delta$ -endotoxinas

En general, las  $\delta$ -endotoxinas se sintetizan como protoxinas que deben ser procesadas en el intestino de las larvas susceptibles a su forma activa que es la toxina. Diversos trabajos demuestran que el fragmento mínimo para que las proteínas CryI sean activas se encuentra en el amino terminal (N-terminal) produciendo una proteína de 60-70 kDa (Chestukina *et al.*, 1982). La porción carboxilo terminal (C-terminal) no se requiere para la actividad tóxica (Wabiko *et al.*, 1985). El alineamiento y comparación de la estructura primaria de las proteínas Cry1, Cry2, Cry3 y Cry4, reveló la presencia de cinco bloques de secuencia de aminoácidos altamente conservados (Fig. 1) (Höfle y Whiteley, 1989); esto implica que las diferencias de aminoácidos entre las diferentes clases no se encuentran distribuidas al azar, además, las regiones muy conservadas están separadas por regiones hipervariables. Al surgir la nueva clasificación y al hacer nuevamente este tipo de alineamientos se encontró que además de los cinco bloques descritos existen otros tres que se localizan en la región C-terminal que es eliminada durante el procesamiento (Lorence-Quñones y Quintero-Ramírez, 1996). Este análisis permitió distinguir tres subgrupos de proteínas Cry. El primer subgrupo está integrado por las toxinas de las clases Cry 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 y 10, este subgrupo tiene los 5 bloques descritos anteriormente; otro subgrupo está formado por las clases Cry 5, 12, 13 y 14, estas toxinas tienen en su estructura primaria bloques homólogos a los bloques 1, 2, 4 y 5, pero no contienen al bloque 3. Las toxinas de más de 70 kDa que integran estos dos subgrupos poseen además los bloques conservados 6, 7 y 8 hacia el extremo carboxilo. Un tercer subgrupo está formado por las clases Cry 2 y 11, estas toxinas tienen el bloque conservado 1 y tienen una variante del bloque 2 pero carecen de los bloques 3, 4 y 5. La alta conservación de estos cinco bloques en la mayoría de las  $\delta$ -endotoxinas sugiere que son importantes para su función biológica.

#### 1.5 Estructura tridimensional de las toxinas Cry

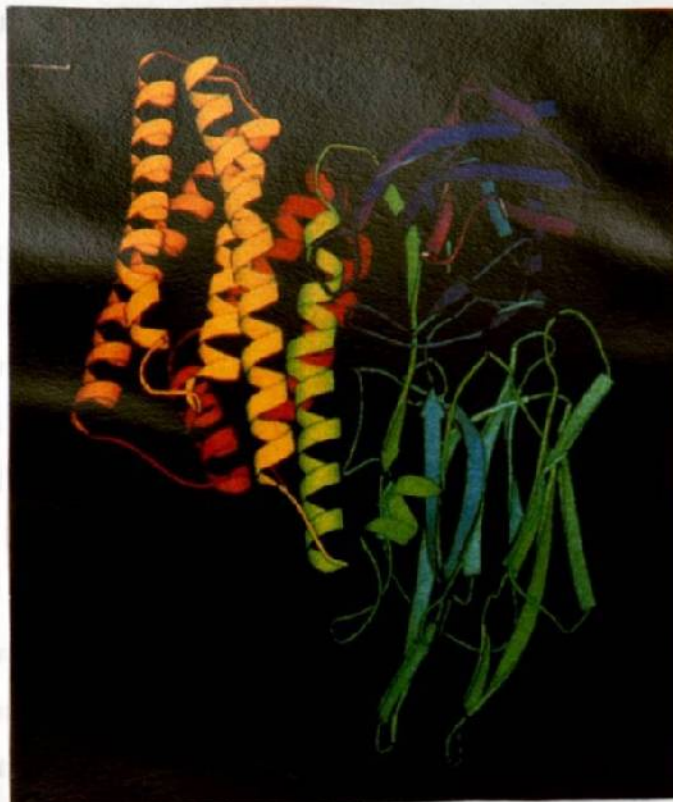
La determinación de la estructura de las toxinas de Bt es una de las más importantes herramientas para la comprensión y mejor aprovechamiento de estas proteínas. En 1991, Li y col. publicaron la estructura tridimensional de la  $\delta$ -endotoxina Cry3A de Bt var *tenebrionis*. Dichos estudios revelaron que esta proteína está formada por tres dominios estructurales: el

dominio I (residuos aminoácidos 1 al 290) está formado por un grupo de 7  $\alpha$ -hélices, seis de ellas están dispuestas alrededor de una central, la  $\alpha$ -hélice 5, el dominio II (residuos 291 al 500) está formado por tres láminas  $\beta$  con arreglo antiparalelo que terminan en asas en el vértice de la molécula, a este tipo de topología se le ha denominado prisma  $\beta$ , el dominio III, de los residuos 501 al C-terminal, tiene una estructura  $\beta$ -sandwich con una topología de doble hélice  $\beta$  (Murzin, 1994).



**Figura 1.-** Representación esquemática de los bloques conservados dentro de la familia de proteínas Cry. Las regiones marcadas con "1 alt" y "3 alt" son posibles bloques 1 y 3 alternativos. Las regiones señaladas como "2 var" son posibles variantes de ese bloque. Los rectángulos indican la posición y tamaño relativo de cada bloque en la proteína. El color negro indica una homología alta, mientras que el gris indica una mayor variabilidad en esa región. Los rectángulos blancos son secuencias alternativas posibles con ligera o sin homología a los bloques canónicos. Las flechas en la parte superior representan la localización de los tres dominios de la toxina Cry3A. (Adaptada de Lorence-Quiñones y Quintero-Ramírez, 1996)

Los cinco bloques de alta homología citados anteriormente, presentan una distribución muy interesante. constituyen la parte central (corazón) de la estructura tridimensional de la toxina. El bloque 1 corresponde a la hélice central  $\alpha$ -5 del dominio I el bloque 2 comprende la segunda parte de la  $\alpha$ -hélice 6, la  $\alpha$ -hélice 7 y la  $\beta$ -1 corresponde a la unión entre los dominios I y II; el bloque 3 incluye a la última parte de la  $\beta$ -11 la cual se une a la  $\beta$ -1 por un puente de hidrógeno y con las asas conectando a los dominios II y III. el resto del bloque 3, junto con el 4 y el 5 forman las tres hebras de la  $\beta$ -plegada interna del dominio III (Figura 2). El alto grado de conservación de los dominios internos implica que todas las proteínas Cry poseen una conformación general muy similar y por lo tanto un mecanismo de acción muy semejante (Li *et al.*, 1991).



**Figura 2.- Estructura tridimensional de Cry3A. Representación realizada a partir de los datos obtenidos por difracción de rayos X. En dirección de izquierda (amino terminal) a derecha (carboxilo terminal): El dominio I se representa con color rojo-amarillo, el dominio II en colores verde-azul y el dominio III en morado-violeta.**

En 1995, Grochulsky y col. aportaron la evidencia que apoya a la afirmación anterior al determinar la estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa de Bt var *kurstaky* cepa HD-1. Este grupo de investigación encontró que el plegamiento de ambas toxinas, Cry3Aa y Cry1Aa, es muy similar: un primer dominio está formado por 8  $\alpha$ -hélices anfipáticas (residuos 34 al 250), un dominio central integrado por tres láminas  $\beta$  (residuos 258 al 457) y un tercer dominio con estructura tipo  $\beta$ -sandwich (residuos 463 al 600)

## 1.6 Modo de acción

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la toxina de Bt constituyen en la actualidad una área de gran interés ya que se considera que si este aspecto se llega a conocer en gran detalle, se podrán diseñar mejores bioinsecticidas, más tóxicos, de espectro de acción más amplio y tal vez se podría entender el desarrollo de resistencia insecticida.

Una vez que la larva ha ingerido la  $\delta$ -endotoxina, los primeros síntomas de envenenamiento son cese de la ingesta y parálisis del tracto alimenticio, posteriormente presenta vómito, diarrea y muerte (Aronson, 1986). Estos efectos empiezan a observarse un minuto después de la administración de las toxinas (Gupta *et al.*, 1985). Los estudios histopatológicos realizados con las células del epitelio intestinal, indican degeneración de las microvellosidades apicales, hipertrofia de las células calciformes y columnares, vacuolización del citoplasma y citólisis (Lüthy y Ebersold, 1981). El hecho de que las proteínas Cry ejerzan su acción en las microvellosidades apicales del intestino medio y la rapidez con que actúan, sugieren que no se internalizan. Bravo y col. (1992), demostraron lo anterior mediante estudios citoquímicos *in vivo* ya que observaron que las toxinas se unen a la microvellosidad apical de las células apicales del intestino medio y no se introducen al citoplasma durante todo el síndrome patológico.

En general, las diferentes etapas que integran el mecanismo de acción de las proteínas Cry son las siguientes: cuando una protoxina entra en el tracto digestivo de la larva, ésta es solubilizada y procesada a la forma tóxica, por acción de proteasas intestinales; el siguiente paso es la unión de la toxina al receptor presente en la microvellosidad apical de las células columnares,



inserción en la membrana celular y formación de poros que conducen a la citólisis. Los estudios de modo de acción de las proteínas Cry generalmente utilizan proteínas tóxicas a lepidópteros y dípteros. Cry1 y Cry4. Los primeros pasos en el modo de acción de las toxinas son la solubilización y posterior procesamiento proteolítico. Los cristales ingeridos por una larva susceptible se disuelven en el ambiente alcalino del intestino medio, liberando así las proteínas del cristal (Gringorten *et al.*, 1992). La composición del lumen intestinal es un factor determinante de la actividad insecticida de las toxinas (Jaquet *et al.*, 1987). Por ejemplo, la actividad de los cristales de varias cepas de Bt contra *H. virescens* fue aumentada por disolución previa *in vitro*, mientras que la misma disolución no tenía influencia sobre la actividad contra larvas de *Pieris brassicae*, esto demuestra que la solubilización es un factor que participa de manera determinante en la especificidad insecticida (Aronson *et al.*, 1991).

Una vez solubilizadas las proteínas del cristal insecticida son procesadas proteolíticamente por las proteasas intestinales de la larva. Puede generalizarse que el fragmento tóxico, al menos para las toxinas Cry1, se genera por el corte de los primeros 28 aminoácidos del dominio N-terminal y de los últimos 500 del C-terminal. (Höfte y Whiteley, 1989). El tamaño de los fragmentos tóxicos resultantes está entre 60 y 78 kDa. Al igual que la solubilidad, el procesamiento proteolítico puede influir sobre la actividad de las proteínas liberadas del cristal de Bt. Un ejemplo de lo anterior, es el caso de Cry1Ab proveniente de Bt var. *aizawai* IC1, la cual es tóxica para lepidópteros y dípteros cuando se procesa con jugo gástrico de lepidópteros. Sin embargo, los fragmentos tóxicos obtenidos con proteólisis de jugos gástricos de dípteros solamente son tóxicos a larvas de dípteros. Esto llevó a la conclusión de que la especificidad dual observada resulta de un procesamiento diferencial de una sola proteína (Haider y Ellar, 1987). Este cambio de especificidad está determinado por los residuos 524-595 en el extremo C-terminal de la toxina, ya que mientras que los residuos 524-558 son importantes para la toxicidad hacia dípteros, los residuos 558-595 lo son para la actividad hacia los lepidópteros (Haider y Ellar, 1989).

Diversos autores demostraron que la membrana peritrófica del intestino medio de la larva es el blanco primario de las toxinas ya que ahí se unen a sitios específicos (receptores) localizados



en las microvellosidades de las células columnares del intestino medio de los lepidópteros (Hofman y Lüthy 1986 Hoffman *et al.* 1988) y coleópteros (Bravo *et al.* 1992b) entre otros. Ya que la unión al receptor es un proceso crítico para la alta especificidad insecticida, se han realizado diversos estudios para comprender mejor este proceso. Se hicieron estudios cuantitativos de unión de las proteínas Cry a vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) preparadas a partir de intestino medio de diversas especies de insectos, estos estudios de unión *in vitro* mostraron una correlación entre la toxicidad y la ocurrencia de sitios de unión de alta afinidad en las vesículas membranales (Hoffman *et al.* 1988 VanRie *et al.* 1989). Estos resultados demostraron que los receptores de las toxinas Cry son piezas determinantes de la especificidad y que altas toxicidades podrían ser el resultado de altas afinidades o de un mayor número de receptores presentes en el intestino medio.

Los estudios de competencia heteróloga han revelado que la unión al receptor no es un proceso simple, ya que una misma toxina puede tener más de un sitio de unión en el mismo insecto o bien varias toxinas pueden competir por el mismo sitio de unión. En *H. virescens* la proteína CryIAc se une a varios receptores, diferentes de aquel por el que compiten CryIAa y CryIAb (Van Rie *et al.* 1989 y MacIntoch *et al.* 1991) dos proteínas muy relacionadas a ésta.

Uno de los principales avances en el análisis del proceso de intoxicación es la purificación de proteínas que tienen aparentemente propiedades de receptores de la toxina. Varios grupos de investigación reportaron la purificación de fracciones que contienen aminopeptidasa-N (APN) como receptor de *Manduca sexta* de CryIAc (Martínez-Ramírez *et al.*, 1994). Como se había predicho de publicaciones previas sobre unión a receptor de células completas o de preparaciones derivadas de intestino medio, la APN de *M. sexta* une proteínas de CryIAc, esta unión es inhibida competitivamente por N-acetilgalactosamina, y fracciones derivadas de intestino medio enriquecidas con APN disminuyen grandemente la concentración de toxina necesaria para formar canales cuando es incorporada a vesículas fosfolipídicas (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994).

## 1.7 Relación estructura-función

Los avances en la ingeniería genética y la biología molecular en la última década abrieron el camino para el análisis y mejor comprensión de la relación estructura/función de las  $\delta$ -endotoxinas.

La determinación de la estructura tridimensional de Cry3A y posteriormente la de Cry1Aa constituyeron una herramienta muy importante en la comprensión del papel que desempeñan las diversas regiones de estas proteínas. La estructura de estas proteínas es muy similar y revela que están compuestas de los dominios estructurales que se describieron anteriormente: el dominio I formado por un paquete de  $\alpha$ -hélices que recuerda a los dominios de otras proteínas que interaccionan con membranas o a dominios formadores de poros de otras toxinas, el dominio II formado por un prisma triangular de láminas  $\beta$  y el dominio III formado también por láminas  $\beta$  empalmadas. Generalmente se presume que las demás  $\delta$ -endotoxinas con secuencias evidentemente relacionadas tendrán un plegamiento similar a las toxinas descritas. La función que se atribuye a cada uno de los dominios proviene de diversas fuentes:

El dominio I, que está constituido por un paquete de  $\alpha$ -hélices, está involucrado en la formación del poro. Diversos trabajos apoyan esta suposición; se hicieron experimentos de mutagénesis sitio-dirigida en la hélice  $\alpha$ -5 de Cry1Ac, para reemplazar los residuos hidrofóbicos con residuos cargados con prolina obteniéndose proteínas atóxicas contra tres insectos altamente sensibles a la proteína nativa, pero cuya capacidad de unión al receptor quedó intacta (Wu y Aronson, 1992,); efectos similares fueron observados con Cry1Ab (Chen *et al.*, 1995). Además, otros grupos de investigadores realizando estudios *in vitro*, confirmaron el papel del dominio I en la formación de poro; utilizando los dominios I de Cry1Ac (Walters *et al.*, 1993) y Cry3Bb (Von Tersch *et al.*, 1994) se observaron que podían formar canales catiónicos en bicapas planas. Por su parte, Gazit y Shai (1993) sintetizaron *in vitro* la región  $\alpha$ -5 de Cry3A y demostraron que era capaz de formar canales iónicos en bicapas lipídicas planas.

El dominio II de las  $\delta$ -endotoxinas se ha involucrado con la interacción directa con el receptor. En la búsqueda de la región que determina la especificidad hacia el insecto se han

realizado diversas estrategias, la más utilizada consiste en buscar regiones de dos proteínas parcialmente homólogas con diferente especificidad de insecto, realizar intercambios de regiones homólogas y determinar cualquier cambio en la especificidad al insecto blanco mediante bioensayos. Las proteínas del tipo CryIA se han utilizado muy frecuentemente en este tipo de experimentos y sus resultados se resumen en la Tabla 2. Cabe señalar que en la mayor parte de los trabajos se han intercambiado regiones muy grandes que no corresponden a los dominios delimitados estructuralmente. La región entre los residuos 332-450 parece determinar las especificidades hacia *T. ni* y *Bombyx mori*. La región 332-772 es la que determina la especificidad hacia *H. virescens*, esta región abarca virtualmente todo el dominio II y el dominio III. Otros grupos de investigadores han realizado trabajos más finos sobre las regiones que determinan la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas; Smith y Ellar (1994) encontraron que la región que probablemente interactúe con el receptor en CryIC es la formada por los residuos que se localizan en las asas 1 y 2 del dominio II. Lu y col. (1994) encontraron que al sustituir los residuos de la asa 1 de CryIAa o bien quitarlos, la proteína mutante resulta tres ordenes de magnitud menos tóxica para *B. mori*. Este y estudios posteriores (Lu *et al.*, 1994; Rajamohan *et al.*, 1996; Wu y Dean, 1996) confirmaron la hipótesis de que las asas localizadas en el vértice del dominio II de la molécula son regiones importantes para la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas.

Tabla 2. Dominios de especificidad de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

	CryIAa	CryIAb	CryIAc	CryICa	Cry2A
<i>Aedes aegypti</i>					307-382 <sup>a</sup>
<i>Bombyx mori</i>	332-450 <sup>b</sup> 332-428 + 428-450 <sup>c</sup> 365-371 <sup>d</sup>				
<i>Heliothis virescens</i>			332-772 <sup>e</sup> A92D, R93X <sup>f</sup>		
<i>Manduca sexta</i>		A92D <sup>f</sup>	429-447 <sup>g</sup> A92C, R93X <sup>f</sup> S503I, S504I <sup>h</sup>		
<i>Spodoptera exigua</i>				454-630 <sup>b</sup> conexiones 1 y 2 <sup>i</sup>	
<i>Trichoplusia ni</i>	A92D <sup>i</sup>		332-447 <sup>g</sup> A92D <sup>f</sup>		

a= Widner y Whiteley, 1990; b= Ge *et al.*, 1989; c= Lee *et al.*, 1992; d= Lu *et al.*, 1994; e= Schnepf *et al.*, 1990; f= Wu y Aronson 1992; g= Aronson *et al.*, 1994; i= Smith y Ellar, 1994.

La función que primeramente se asoció al dominio III fue la de mantener la integridad de la proteína, ya que las toxinas mutantes en esta región son muy inestables al tratamiento con proteasas (Li *et al.* 1991). Estudios posteriores han demostrado que este dominio participa de manera más activa interactuando con el dominio I en la de formación de poro y con el dominio II en la especificidad insecticida. Realizando mutagenesis sitio-dirigida en el bloque 5 de CryIAb se logró demostrar que el dominio III es importante para el mantenimiento y la estabilidad de la estructura proteica (Martens *et al.*, 1995) y que participa mediante la formación de enlaces iónicos con el dominio I (Li *et al.*, 1991). Además, Lee *et al.*, (1995) realizando experimentos de "ligand-blot" con receptores aislados de CryIA demostraron que el dominio III está involucrado en la unión al receptor en *Limantria dispar*. Como se puede observar, el dominio III podría tener otras funciones, las cuales todavía están por demostrarse, quizás este involucrado en la especificidad.

En base a los estudios que se tienen sobre las funciones de cada uno de los dominios y por comparación con otras proteínas transmembranales que son canales iónicos, recientemente se propusieron dos modelos posibles de inserción en la membrana y formación de poro de las  $\delta$ -endotoxinas (Knowles, 1994). Un modelo propone que las hélices  $\alpha$ -5 y  $\alpha$ -6 son las que se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional ocasionado por la unión de la toxina con su receptor, es el modelo del "abrecartas", sin mayor participación de las hélices restantes. El otro modelo sugiere también que como consecuencia de dicho cambio conformacional podrían ser las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 las que se inserten en la membrana, mientras que el resto de ellas se aplanan sobre la superficie de la misma, exponiendo hacia ellas sus caras hidrofóbicas en forma parecida a un "paraguas".

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los genes de las $\delta$ -endotoxinas, hospederos y vectores.

Las características de las cepas bacterianas y los plásmidos que se utilizaron se muestran en la Tabla 3. La cepa bacteriana receptora de los plásmidos empleados fue *Escherichia coli* JM101 donada por Instituto de Biotecnología de la UNAM. La cepa de *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 obtenida de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL, (Rodríguez-Padilla *et al.*, 1993) se usó como fuente del gen *cryIAc*, ya que contiene únicamente este gen *cry* en forma natural. Los plásmidos empleados fueron pES1, que contiene al gen *cryIAa* proporcionado por el Dr. Aronson (Purdue University, West Lafayette Indiana) y pUC19 que se utilizó como vehículo de clonación de los genes modificados se obtuvo del fabricante (Boehringer-Mannheim), contiene el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos

	Genotipo	Referencia
<b>Cepa bacteriana</b>		
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE thi Δ(lac-proAB) F[tra]136 proAB<sup>+</sup> lacZ<math>\Delta</math>M15]</i>	Messing, 1979
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i> HD-73	<i>cryIAc</i> silvestre	Adang, <i>et al.</i> , 1985
<b>Plásmidos</b>		
pES1	<i>cryIAa</i> (región tóxica) en pBR322	Schnepf y Whiteley, 1981
pUC19	promotor <i>lac</i> , Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

## I. Identificación de los dominios

Las secuencias proteicas y nucleotídicas utilizadas en este trabajo se obtuvieron del banco de datos "NewGeneBank" las claves de acceso para la búsqueda de las secuencias fueron para *cryIAa*, M11250 (Schnepf *et al.*, 1985), para *cryIAc*, M11068 (Adang *et al.*, 1985) y para *cry3A*, Y00420 (Höfte *et al.*, 1987) Para delimitar las regiones que corresponden a cada uno de los dominios de las toxinas *CryIA* por comparación con la secuencia proteica de *Cry3A*, se utilizaron los programas computacionales GENALIGN y los algoritmos LFASTA y Clustal 1.5 (Higgins y Sharp, 1988) Con el programa DNASTar 1.1 (Ch Marck and C E A Gif-sur-Yvette France) se analizaron los patrones de restricción de las secuencias nucleotídicas para seleccionar y/o diseñar los sitios adecuados para delimitar cada uno de los dominios de las toxinas analizadas

## II. Delimitación de los dominios

### *Diseño de oligonucleótidos.*

Para delimitar los dominios se diseñaron experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para introducir mutaciones puntuales que generaran sitios únicos de restricción De esta forma, las secuencias nucleotídicas que codifican para cada uno de los dominios quedaron definidas por sitios de restricción que se identifican como P, B, G, K para *PstI*, *BamHI*, *BglII* y *KpnI*, respectivamente Cabe indicar que las mutaciones que se introdujeron para crear los sitios de restricción no cambiaron el marco de lectura, aunque producen cambios en uno o dos codones en regiones de unión de dos dominios; éstos cambios son conservados y no afectan la estructura de la toxina, según se determinó con el programa Predict 7 (Cármenes *et al.*, 1989); todos estos sitios, a excepción de *BglII*, también se localizan en la región múltiple de clonación de pUC19 Los oligos diseñados para las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 4, fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM siendo previamente analizados con el programa Oligo (ver 3.3, Natl. Biosciences Inc., M.N. USA) para determinar la formación de estructuras secundarias y de dímeros y con el programa Amplify (ver 1.2b, Engels, 1992, Univ. Wisconsin)

para probar la capacidad de los oligos de iniciar una PCR y para conocer el tamaño de los fragmentos generados utilizando un ensayo simulado de amplificación génica. Los oligos que se diseñaron para la amplificación de los dominios de *cryIAa* tienen las siguientes características. Para subclonar el dominio I de *cryIAa*, se diseñaron los oligos BP7, que genera un sitio de restricción para *PstI* ubicado hacia el extremo 5' de los promotores de los genes *cry* y el oligo ZJ2 que crea un sitio para *BamHI* mediante la inserción de un codón para glicina después del aminoácido 251. Los oligonucleótidos utilizados para el dominio II fueron los oligos ZJ1 y ZJ4, éste último que crea un sitio para *BglII* en el extremo 3' (aunque no cambia la secuencia primaria de la proteína) y los oligos ZJ3 y ZJ5 para amplificar el dominio III. Por otra parte, los oligos que se diseñaron para la amplificación de los dominios de *cryIAc* tienen características semejantes a las descritas para *cryIAa*.

#### *Mutagénesis sitio-dirigida de cryIAa y cryIAc*

Todas las técnicas de biología molecular e ingeniería genética para la subclonación, transformación, PCR, selección de mutantes, etc. se realizaron esencialmente como se describen en el manual de Sambrook y col. (1989). En la sección de Apéndices (D a J) se describen detalladamente los procedimientos comunes más utilizados. Las enzimas de restricción, reactivos para amplificaciones por PCR y demás materiales de biología molecular fueron obtenidos y utilizados de acuerdo a lo señalado por el proveedor (Boehringer-Mannheim).

#### *PCR de los genes cry*

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Pereyra-Alfárez (1992). Para amplificar los dominios de *cryIAa* se utilizó la siguiente mezcla de reacción: dNTP's, 200  $\mu$ M; DNA, 10 ng, oligonucleótidos específicos, 50 pmol de cada uno; buffer de PCR 10x, 10  $\mu$ l; Taq DNA polimerasa, 5 U; agua nanopura suficiente para 100  $\mu$ l. El termociclador que se utilizó fue un Perkin Elmer (Cetus Co. Emeryville, Ca. E. U.) utilizando un programa con los siguientes pasos: desnaturalización a 92° por 1.5 min., 60° 1.5 min., 70° por 3 min. por un total de 30 ciclos y posteriormente un ciclo de 5 min. a 70°.

TABLA 4. Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia	Posición con respecto al primer codón de traducción
BP7	5' TTTAGTCTGCAGTTAGTTAGTTGCAC <del>TTT</del> GTGC 3' 29mero. introduce sitio para <i>Pst</i> I y Tm de 70	-128 A -102*
ZJ1	CCTATGATGGATCCCGAAGGTATCC 25mero, sitio para <i>Bam</i> HI y Tm de 70	748 A 767**
ZJ2	CTTCGGGATCCATCATAATTTGAGAATAG 29mero. sitio para <i>Bam</i> HI y Tm de 80	736 A 761**
ZJ3	CAGCATAGATCTGCTGAATTTAATAAT 27mero, sitio para <i>Bgl</i> II y Tm de 70	1363 A 1389**
ZJ4	GCAGCAGATCTATGCTGCCAAGAAAACG 28mero. sitio para <i>Bgl</i> II y Tm de 84	1352 A 1378**
ZJ5	CTCATCAAAGGTACCCAATAGCGTAAC 27mero, sitio para <i>Kpn</i> I y Tm de 78	2155 A 2181**
ZJ6	CCTATGATGGATCCAGAAGATATCC 27mero, sitio para <i>Bam</i> HI y Tm de 72	748 A 767***
ZJ7	CTTCTGGATCCATCATAATTCGGGAACAG 29 mero, sitio para <i>Bam</i> HI y Tm de 84	736 A 761***
ZJ8	ATACATAGATCTGCTGAATTTAAT 24mero. sitio para <i>Bgl</i> II y Tm de 60	1366 A 1389***
ZJ9	TCAGCAGATCTATGTATCCAAGAGAACA 28mero. sitio para <i>Bgl</i> II y Tm de 78	1355 A 1382***
ZJ10	CTCATCAAAGGTACCTGATAGTGTGAC 27mero. sitio para <i>Kpn</i> I y Tm de 78	2161 A 2187***

NOTAS: \* diseñados para amplificar a partir del extremo 5' de cualquier gen *cry*IA (Pereyra-Alferez, 1992)

\*\* diseñados para amplificar *cry*IAa

\*\*\* diseñados para amplificar *cry*IAc

+ Tm "Temperatura melting". Temperatura a la que el 50% del DNA se encuentra como cadena sencilla

El DNA templado utilizado en las reacciones de PCR de *cry*IAc se obtuvo utilizando el método descrito por Cerón y col. (1994). Una asada de un cultivo de 12 horas de *B. thuringiensis* HD-73 crecida en agar LB, fué resuspendida en 100 µl de agua nanopura y se colocó en baño de agua hirviendo durante 10 min; los tubos se centrifugaron un min a 10000 rpm. A partir del sobrenadante se tomaron 30 µl para las reacciones de PCR. Para amplificar el



dominio I y III se utilizaron las mismas condiciones que para cryIAa, en cambio, para el dominio II se modificó la temperatura de alineamiento a 50° y el número de ciclos se incrementó de 25 a 30

Todas las reacciones de PCR se hicieron por duplicado para obtener mayor cantidad de muestra de cada dominio y facilitar manipulaciones posteriores. Después de la amplificación, las mezclas de reacción se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y los productos obtenidos fueron purificados.

### III. Subclonación de los genes nativos

La estrategia para subclonar los genes cry se muestra en la Figura 3 y se describe en detalle en las siguientes secciones

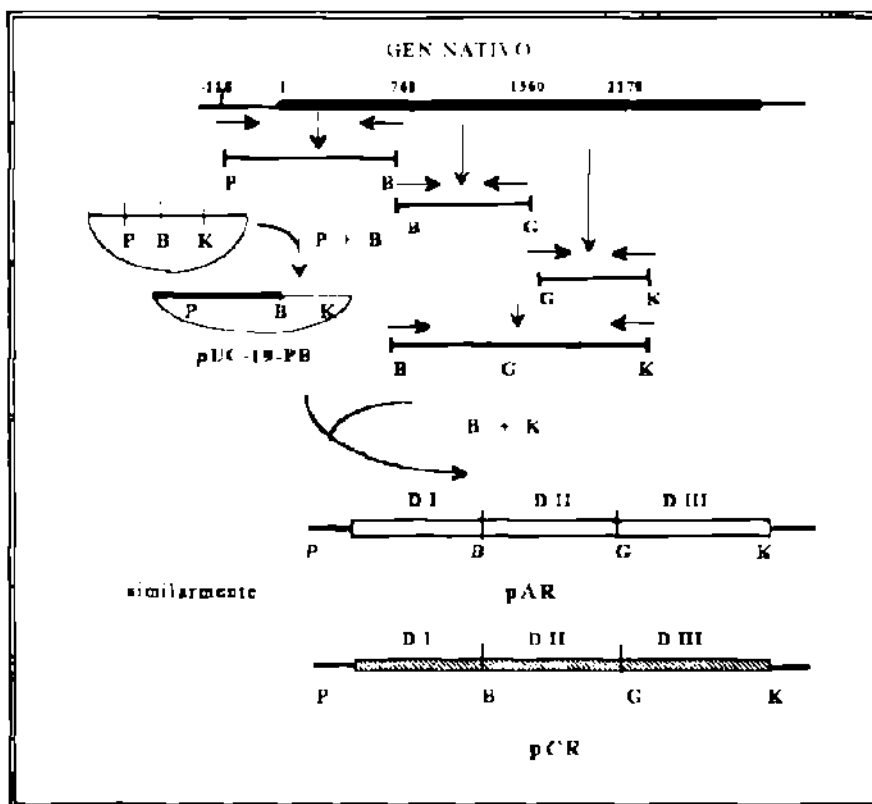


Figura 3. Estrategia general para subclonar el fragmento tóxico de CryIAa y CryIAc y delimitar los dominios con sitios únicos de restricción. Las flechas horizontales indican la dirección de los oligonucleótidos en la PCR. En el texto se especifica los oligonucleótidos a utilizar en cada caso y la nomenclatura de los sitios de restricción utilizados

*Subclonación del dominio I*

Un esquema general de la metodología planeada para subclonar el dominio I se presenta en la Figura 4. El plásmido pUC19 y el segmento amplificado que corresponde al dominio I, una vez purificados se digirieron con PstI, y posteriormente con BamHI y los productos purificados se resuspendieron en agua. La mezcla del inserto (dominioI) y el vehículo de clonación se ligaron y se emplearon para transformar células "competentes" JM101 por las técnicas de electroporación o por el método químico con CaCl<sub>2</sub>. Las colonias resistentes a ampicilina (50µg/ml en todos los casos que se usó este marcador de selección) se levantaron con palillos estériles, se inocularon en tubos con caldo LBamp y en cajas con agar LBamp. De cada cultivo se aislaron plásmidos que se compararon con el vehículo sin inserto y se seleccionaron aquellos que tuvieron un plásmido con un patrón de bandas de mayor talla que el vector. Finalmente, los plásmidos seleccionados se caracterizaron por su patrón de restricción con las enzimas PstI y BamHI y las que dieron el patrón esperado, se sembraron en agar LBamp y se guardaron en refrigeración. De esta manera se obtuvo el plásmido pUC19-DIAa. Para subclonar el dominio I de cryIAc se utilizó la misma metodología anterior utilizando como inserto el producto amplificado que corresponde a dicho dominio y así obtener el pUC19-DIAc.

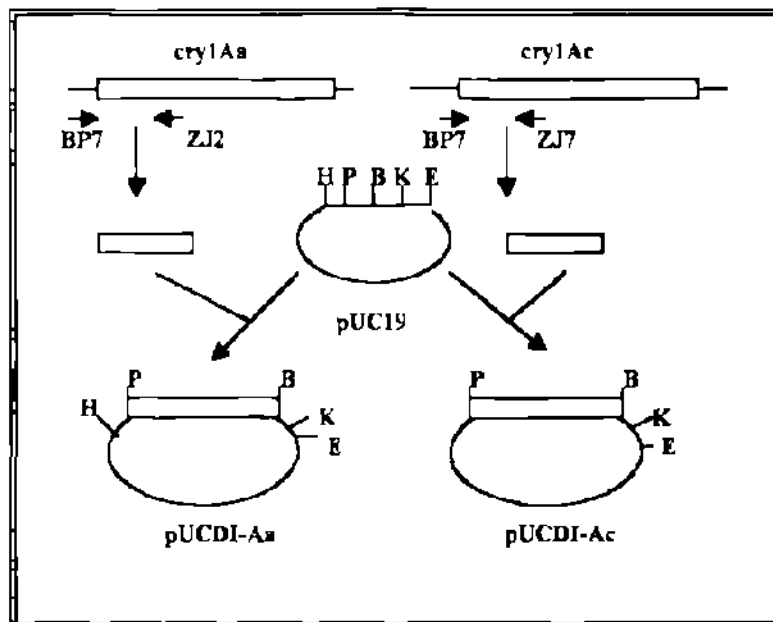


Figura 4. Clonación del dominio I en *E. coli*. El vehículo de clonación fue pUC19 y se obtuvieron los plásmidos pUCDI-Aa y pUCDI-Ac con el dominio I insertado.

*Reconstrucción de los genes nativos de cryIAa y cryIAc*

Siguiendo una metodología similar a la utilizada para subclonar el dominio I se logró la subclonación de los dominios II y III y la consecuente subclonación de los genes nativos (Figura 5) Para subclonar *cryIAa* se hizo primeramente una PCR del plásmido original (pES1) utilizando los oligos ZJ1 y ZJ4 para producir el segmento B-G (que corresponde al dominio II delimitado por *Bam*HI y *Bg*III) y otra PCR usando como iniciadores los oligos ZJ3 y ZJ5 para amplificar el segmento G-K (que corresponde al dominio III flanqueado por los sitios de restricción *Bg*III y *Kpn*I) Los segmentos de estas reacciones de PCR se unieron a través de otra PCR usando los oligos ZJ1 y ZJ5 para obtener el segmento B-K que contiene un sitio intermedio para G. Este último segmento se unió a pUC19-D1Aa mediante la digestión con B y K y posterior unión con la enzima DNA ligasa. Así se obtuvo el plásmido pAR (o AAA, porque lleva los segmentos que codifican para los dominios I, II y III de CryIAa) que lleva el gen de la toxina CryIAa. Similarmente se trabajó con *cryIAc* y los oligos BP7 y ZJ7 para el dominio I, ZJ6 y ZJ9 para el dominio II y ZJ8 y ZJ10 para amplificar el dominio III y crear el plásmido pCR (o CCC) que codifica para la proteína truncada CryIAc. Cada uno de los plásmidos subclonados se caracterizaron por su patrón de sitios de restricción utilizando las enzimas *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RV, *Pst*I y *Hind*III

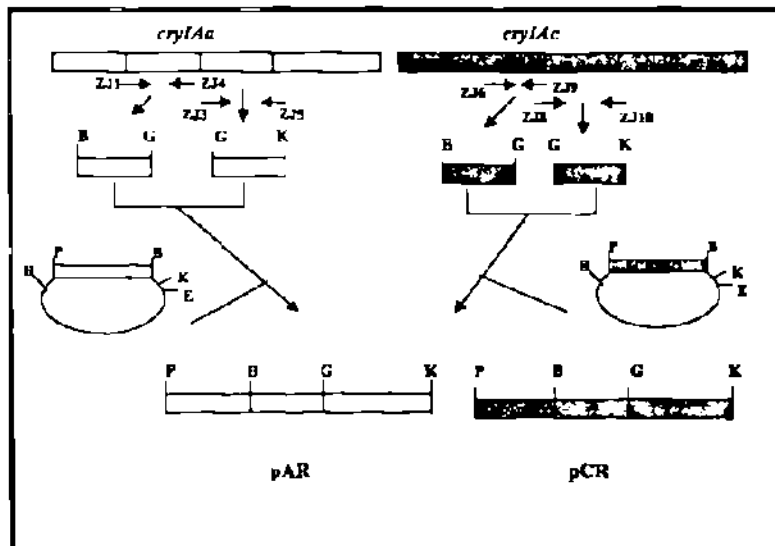


Figura 5. Diagrama que muestra la reconstrucción de los genes nativos delimitados con los sitios de restricción introducidos

#### IV. Intercambio del dominio II

En la Figura 6 se muestran la estrategia utilizada para intercambiar el dominio II entre los diferentes genes *cry*. El plásmido pAR purificado se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II y para obtener el segmento B-G que delimita al dominio II y el segmento pUC19 con los dominios I y III unidos; de igual forma se trato a pCR. Posteriormente, los segmentos fueron purificados a partir de los geles de agarosa, se intercambiaron los segmentos B-G y se ligaron con el plásmido contrario. Las construcciones resultantes fueron *cry*1Aa con el dominio II de *cry*1Ac y *cry*1Ac con el dominio II de *cry*1Aa, respectivamente. Se transformaron células de *E. coli* por electroporación y se seleccionaron las clonas adecuadas como se describió anteriormente. El análisis de restricción de los plásmidos resultantes se realizó con las enzimas *Eco*RV y *Pst*I. Los plásmidos obtenidos fueron pAC2 (ACA) y pCA2 (CAC) que corresponden a *cry*1Aa con el dominio II de *cry*1Ac y *cry*1Ac con el dominio II de *cry*1Aa.

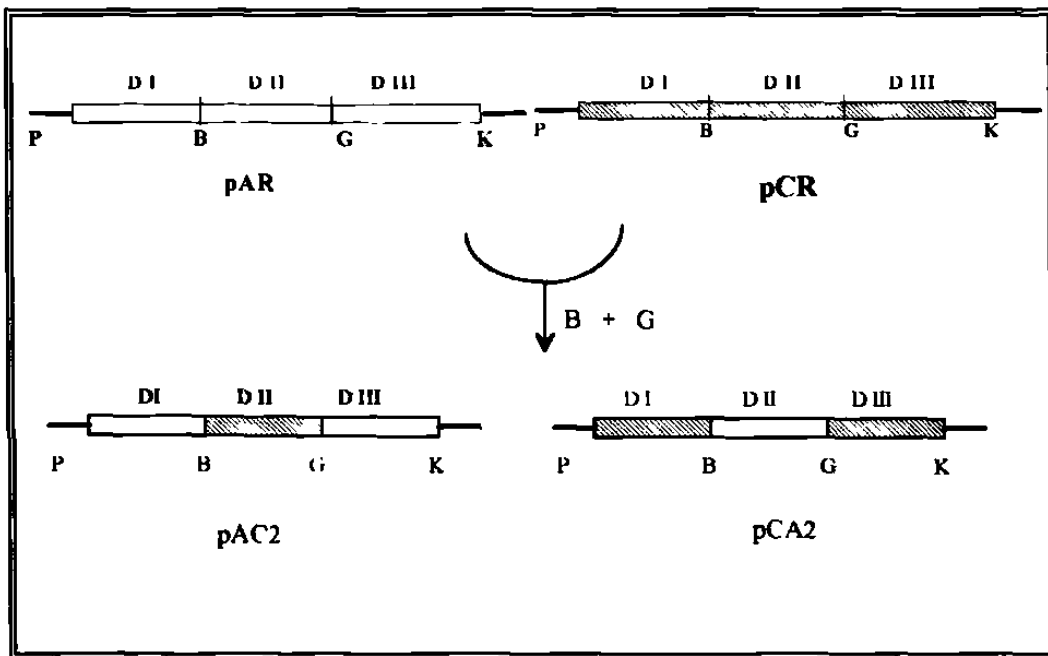


Figura 6. Intercambio del dominio II entre los genes *cry*1Aa y *cry*1Ac

## V. Intercambio de los dominios I Y III

A partir de los dominios II de *crv1Aa* y III de *crv1Ac* se hizo una PCR y se utilizó como vehículo de clonación pUCD1Aa para obtener el plásmido pAC3 (AAC). Con estos experimentos de PCR de los dominios II y III de los diversos genes y con los vehículos de clonación adecuados (pUCD1), se realizaron diversos intercambios de dominios, siguiendo la misma estrategia que se utilizó en la reconstrucción de los genes nativos. Las construcciones genéticas a obtener fueron pAC1 (CAA), pCA3 (CCA) y pCA1 (ACC).

## VI. Producción de las toxinas quiméricas

Los genes mutantes fueron expresados en *E. coli* JM101 en base a la metodología propuesta por Smith y Ellar (1994). Con cada una de las clonas recombinantes obtenidas se inocularon en matraces con 50 ml de caldo LBamp y se incubaron por 36 h a 200 rpm a 37°C. Se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C, se lavaron dos veces con 5 ml de buffer PBS centrifugándolas de igual manera y se resuspendieron en un volumen final de 3 ml de buffer PBS. Las células se sonicaron por pulsos de 30 seg a la máxima amplitud (colocadas en hielo todo el tiempo) durante 7 min con intervalos de un min con un sonicador Cole Parmer 4710 (USA). El grado de lisis celular se determinó observando al microscopio frotis teñidos con cristal violeta. Cuando se completó la lisis celular, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y el precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer PBS. Para cada una de las muestras se determinó la cantidad de proteína total por el método de Bradford (1976).

El perfil de proteínas de las clonas recombinantes se determinó por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-SDS al 12% bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Se colocaron 15 µg de proteína total en cada carril y se corrieron a 10 y 20 mA por el gel concentrador y separador, respectivamente. Las proteínas se visualizaron mediante tinción de los geles con azul de Coomassie.

Para detectar las proteínas Cry se hicieron inmunodetecciones según se muestra en el apéndice M (Sambrook, *et al.* 1989). Primero se corrieron geles de poliacrilamida con 30 a 35  $\mu\text{g}$  de proteína total por carril bajo las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, las proteínas se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia (Hoefer, USA) a 250 mA durante toda la noche. Las membranas se trataron con una mezcla de anticuerpos policlonales obtenidos de conejo. Para CryIAa se utilizó el anticuerpo anti-CryIAb, mientras que para CryIAc se utilizó un anticuerpo obtenido de la fracción tóxica de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* HD-73. Como segundo anticuerpo se usó un conjugado enzimático anti-IgG conejo acoplado a fosfatasa alcalina y la presencia de las proteínas Cry se detectó con una solución cromogénica con los sustratos BCIP y NBT.

## VII. Bioensayos

Para probar la actividad biológica de las toxinas obtenidas, se utilizó el método descrito por Hofte y col (1986). Se usaron 80  $\mu\text{l}$  de mezcla de cada toxina para cubrir 7  $\text{cm}^2$  de dieta artificial y se dejó secar al aire; todas las muestras se probaron a una concentración de 10  $\mu\text{g}$  de proteína total por  $\text{cm}^2$  de dieta artificial. Se utilizaron 24 larvas de *Trichoplusia ni* por toxina; después de 7 días de iniciado el experimento se registró el número de larvas vivas y se obtuvo el porcentaje de mortalidad. Los experimentos se repitieron 3 veces y se analizaron por el método de ANOVA (Zar, 1974).

## RESULTADOS

### 1.- Identificación de los tres dominios en Cry1Aa y Cry1Ac por comparación y alineamiento de su secuencia de aminoácidos con Cry3A.

Al hacer el alineamiento de las secuencias primarias de aminoácidos de las toxinas Cry3A con las de Cry1Aa y Cry1Ac se localizaron las regiones que delimitan a cada uno de los dominios de las toxinas estudiadas. Tomando como referencia la proteína Cry3A, cuyos dominios se conocen (el dominio I. del aminoácido 63 al 285, el dominio II comprende los residuos del 294 al 494 y el dominio III va del residuo 501 al 644) se definió Cry1Aa de la siguiente manera: el dominio I comprendió del residuo 26 al 249, el dominio II incluyó los residuos 258 al 454 y el dominio III del 462 al 607. Para Cry1Ac los dominios delimitados fueron: para el dominio I del 26 al 249, el dominio II fue del 258 al 455 y el dominio III correspondió del 463 al 609. El resultado de los alineamientos se muestran en el Apéndice A y se esquematizan en la figura 7.

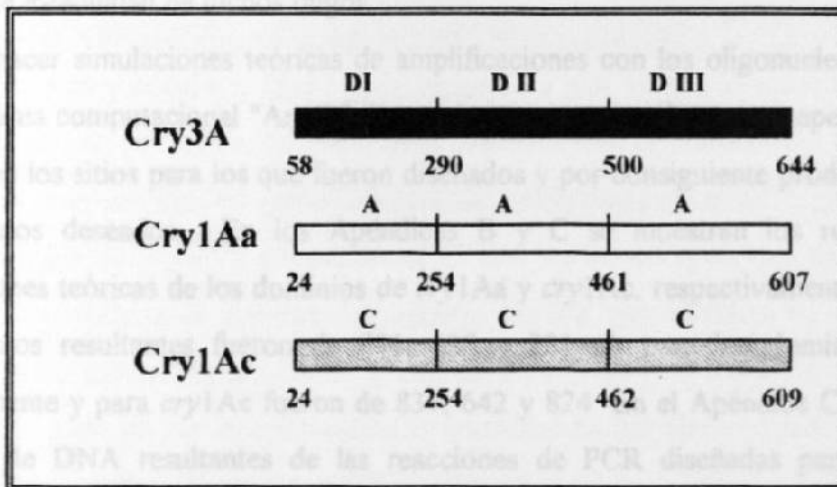


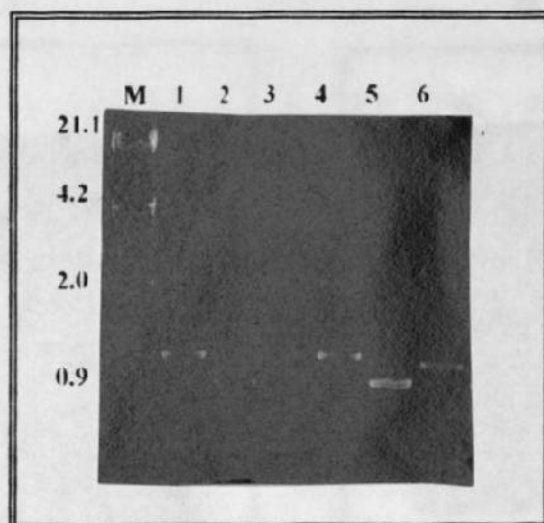
Figura 7. Delimitación de cada uno de los dominios de las proteínas Cry1A por comparación con los de Cry3A. La terminología AAA indica los dominios I, II y III de Cry1Aa y CCC indica los doiminius i, II y III de Cry1Ac

**2.- Delimitar los tres dominios en ambos genes, introduciendo sitios de restricción únicos, mediante mutagénesis sitio-dirigida, con la finalidad de subclonarlos independientemente.**

Al analizar los patrones de restricción de las secuencias nucleotídicas estudiadas se encontró un sitio de restricción natural para la enzima *KpnI* hacia el extremo carboxilo del dominio III de las toxinas CryIA. este sitio se encuentra en la posición nucleotídica 2169 (con respecto al primer codón de traducción) de *cryIAa* en el residuo G723, y en la posición 2173 nucleotídica de *cryIAc* en el aminoácido G725. Los demás sitios de restricción se crearon utilizando mutaciones sitio-dirigidas. En *cryIAa*, se introdujo un sitio para *PstI* en la posición -122 con relación al sitio de inicio de la traducción, de esta manera se amplificaron también los promotores naturales del gen, entre los dominios I y II se introdujo un sitio para *BamHI* en la posición 754 nt después del sitio de inicio de la traducción, que induce la adición de una glicina después del residuo 251. finalmente para flanquear los dominios II y III se creó el sitio para *BglII* al cambiar la secuencia nucleotídica 1369-1374, este cambio no altera el aminoácido a insertar en esa región. Con *CryIAc* el diseño siguió el mismo estrategia: Se creó un sitio para *PstI* en la posición -122, se introdujo un sitio para *BamHI* en la posición 754 y se creó el sitio para *BglII* al cambiar los nucleótidos 1371-1376. En la Tabla IV se muestran los oligonucleótidos diseñados para introducir los sitios de restricción y en el Apéndice B aparece el análisis de estabilidad de dichos oligos.

Al hacer simulaciones teóricas de amplificaciones con los oligonucleótidos diseñados en el programa computacional "Amplify", se encontró que son altamente específicos pues solo se alinean en los sitios para los que fueron diseñados y por consiguiente producen únicamente los segmentos deseados. En los Apéndices B y C se muestran los resultados de las amplificaciones teóricas de los dominios de *cryIAa* y *cryIAc*, respectivamente. Para *cryIAa*, los segmentos resultantes fueron de 896, 639 y 821 pb para los dominios I, II y III, respectivamente y para *cryIAc* fueron de 837, 642 y 824. En el Apéndice C se muestran los segmentos de DNA resultantes de las reacciones de PCR diseñadas para amplificar los dominios. En la Figura 8 se muestran los segmentos amplificados del tamaño predicho por el análisis teórico, y cabe indicar que las reacciones de PCR fueron muy selectivas y no se formaron productos secundarios.





**Figura 8.** Productos amplificados de los genes *cry1Aa* y *cry1Ac* mediante PCR. Carril: 1, marcador de talla molecular (DNA del fago lambda digerido con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI; 2 - 4 segmentos amplificados de los dominios I, II y III de *cry1Aa*, respectivamente; 5 - 7 segmentos amplificados de los dominios I, II y III de *cry1Ac*, respectivamente.

### 3.- Subclonar los dominios en *E. coli* para reconstruir los genes *cry1Aa* y *cry1Ac*.

#### Subclonación del dominio I

Los segmentos amplificados que corresponden al dominio I de *cry1Aa* y *cry1Ac* fueron digeridos con *Pst*I y *Bam*HI y ligados por separado a pUC19 previamente digerido con esas enzimas. El vehículo de clonación linearizado tuvo una talla de 2400 pb y el inserto (dominio I) de 896 pb; una vez ligados tienen una talla de aproximadamente 3400 pb (Fig. 9A). Con esta construcción se procedió a transformar *E. coli* utilizando la técnica de electroporación. Las colonias obtenidas se estudiaron mediante análisis con enzimas de restricción: Los plásmidos de las colonias sospechosas se digirieron con *Pst*I y las clonas positivas produjeron una banda de 3400 pb que corresponde a la linearización del pUC19 unido al dominio I; un corte posterior con *Bam*HI produjo la liberación del dominio I como se indica en la Fig. 9B. De esta forma se confirmó la clonación del dominio I de *cry1Aa* en pUC19 para obtener el plásmido denominado pUC19DIAa; la misma estrategia se siguió para obtener el plásmido pUCDIAc que corresponde a pUC19 con el dominio I de *cry1Ac*.

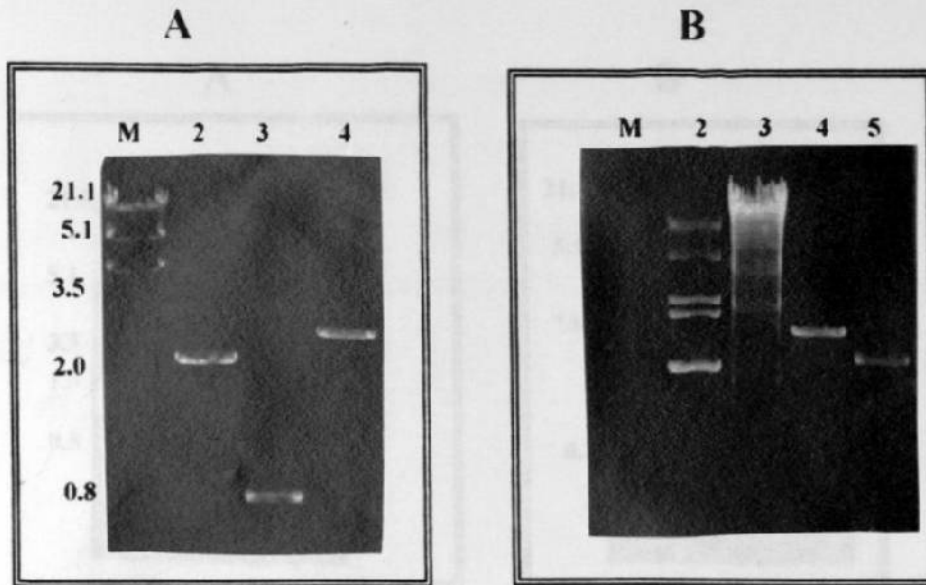


Figura 9.- Construcción y clonación del dominio I de *cryIAa*. Pánel A carriles: 1, Marcador de talla molecular (Kpb), 2, pUC19 digerido con P y B, 3, dominio I de *cryIAa* digerido con P y B, 4, ligación del pUC19 con el Dominio I de *cryIAa*. Pánel B carriles: 1, pUC19 superenrollado, 2, pUC19-DI superenrollado, 3, Marcador de talla molecular (Kpb), 4, pUCDIAa digerido con P y 5, pUC19-DI digerido con P y B.

### Subclonación de los genes *cryIAa* y *cryIAc*

Los dominios II y III se amplificaron con los oligos correspondientes y posteriormente se utilizaron como templados de otra PCR con los oligos 5' del dominio II y 3' del dominio III. El pUC19DI se digirió con *Bam*HI y *Kpn*I y se ligó con el segmento dominio II-III digerido con las mismas enzimas. De esta forma se completó la subclonación y se obtuvieron los plásmidos pAR y pCR con los dominios delimitados que se analizaron por patrón de restricción (Fig. 10). Al ser digeridos con las enzimas de restricción adecuadas produjeron bandas de tamaños característicos: pAR al digerirse con *Bam*HI y *Bgl*II produjo dos segmentos, el dominio II (639 pb) y el pUC19 con los dominios I y III (4217 pb); con *Eco*RV se produjeron 2 segmentos de mil y mil quinientos respectivamente; con *Pst*I liberó dos segmentos de 300 y 4560 y con *Hind*III se linearizó solamente. Al ser digerido pCR con *Bam*HI y *Bgl*II se produjeron dos segmentos, el dominio II (642 pb) y el pUC19 con los dominios I y III (4161 pb); con *Eco*RV se produjeron 2 segmentos de mil y mil quinientos respectivamente; con *Pst*I liberó dos segmentos de 300 y 4560 y con *Hind*III se linearizó solamente. Con la estrategia descrita se subclonaron los genes *cryIAa* y *cryIAc* con los dominios delimitados por sitios de restricción resultando en los plásmidos pAR y pCR, respectivamente.

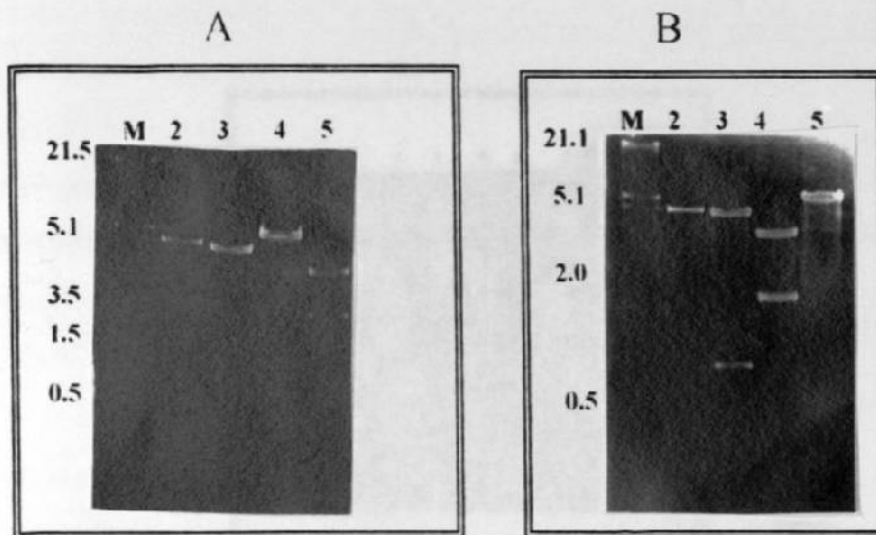


Figura 10. Análisis de restricción de los genes nativos subclonados. Pánel A, análisis de restricción de pAR. Carriles: 1, marcadores de talla molecular (Kpb), 2 al 5, pAR digerido con B-G, EcoRV, P y H, respectivamente. Pánel B, análisis de restricción de pCR. Carriles: 1, marcadores de talla molecular (Kpb), 2 al 5 pCR digerido con B-G, EcoRV, P y H, respectivamente.

#### 4.- Intercambios recíprocos del dominio II entre *cry1Aa* y *cry1Ac*, para construir genes quiméricos.

Los genes reconstruidos pAR y pCR fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Bg*II. Ambas digestiones produjeron dos segmentos, uno de alrededor de 640 pb que corresponde al dominio II y otro de 4200 pb que es el vehículo y los dominios I y III. Los productos de las digestiones se purificaron y se procedió a una nueva ligación, el dominio II de pAR con el resto de pCR y viceversa. Los resultados se muestran en las figuras 11 y 12 y corresponden a la elaboración de pAC2 y pCA2. El pAC2 al digerirlo con *Eco*RV produce una banda de 797 pb que migra semejante a la de pCR 816 pb, pero al digerirlo con *Pst*I solamente se lineariza que lo hace diferente a pCR pues este forma tres bandas dado que tiene tres sitios para esta enzima. En el caso de pCA2, al digerirlo con *Eco*RV la banda distintiva es de 689 pb que lo asemeja al patrón de pAR que produce una banda de 670 pb, pero al digerirlo con *Pst*I se forma un patrón de restricción semejante al de pCR que indica que posee el dominio III de *cry1Ac*.

V. Intercambio de los dominios I y II

Para realizar el intercambio de los dominios I y II, se usó la misma estrategia que para la construcción de los genes nativos. En la figura 11 se muestran las construcciones obtenidas utilizando la siguiente metodología: se usó el vector pCR de los dominios II y III de *lytAa* y usando como vehículo de clonación el plásmido pAC1(CAA). Con estos experimentos se obtuvieron los genes nativos y los genes con los vehículos de clonación. Se realizaron diversos intercambios de dominios, y finalmente se obtuvieron los genes recombinantes.

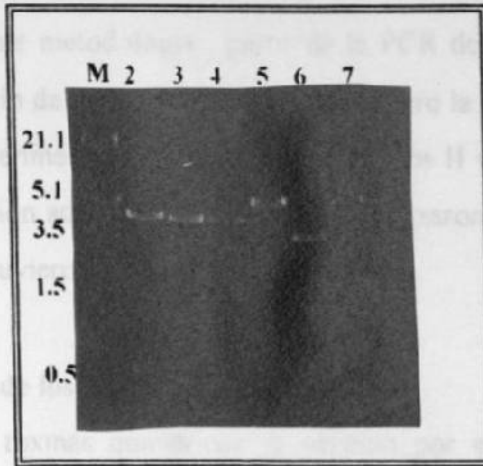


Figura 11. Análisis de restricción del plásmido pAC2. Carriles 1. Marcador de Kpb, 2,3 y 4 pAR, pCR y pAC2 digeridos con *EcoRV*; 5, 6 y 7 pAR, pCR y pAC2 digeridos con *PstI*

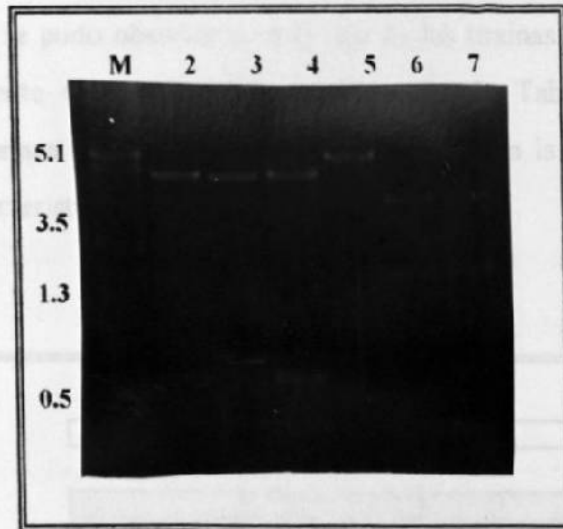


Figura 12. Análisis de restricción del plásmido pCA2. Carriles 1. Marcador de Kpb, 2,3 y 4 pAR, pCR y pCA2 digeridos con *EcoRV*; 5, 6 y 7 pAR, pCR y pCA2 digeridos con *PstI*

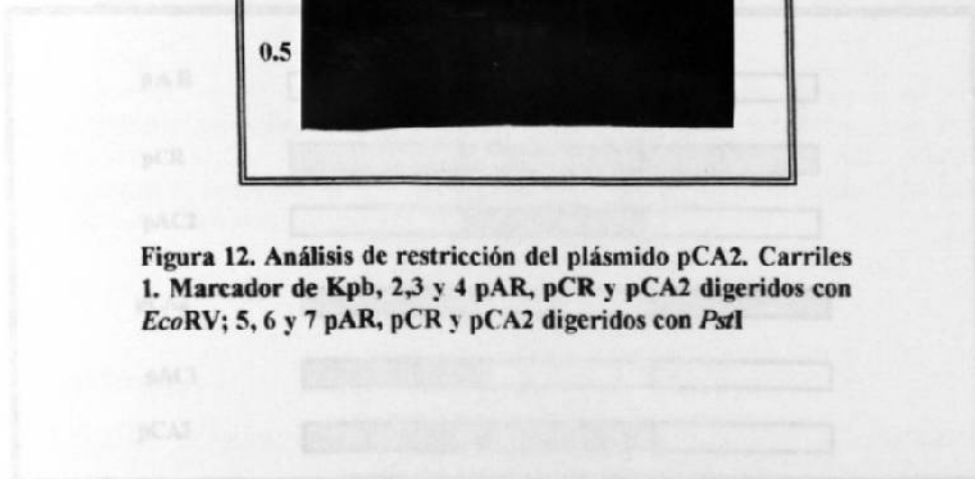


Figura 13. Construcciones genéticas que sirven de vehículo de clonación de los genes nativos con los sitios de restricción introducidos y de construcción de los dominios entre ellos.

### V. Intercambio de los dominios I y III

Para realizar el intercambio de los demás dominios se utilizó la misma estrategia que para la construcción de los genes nativos. En la Figura 13 se muestran las construcciones obtenidas utilizando la siguiente metodología: partir de la PCR de los dominios II y III de *cryIAa* y usando como vehículo de clonación pUC1Ac se logró la construcción del plásmido pAC1 (CAA). Con estos experimentos de PCR de los dominios II y III de los diversos genes y con los vehículos de clonación adecuados (pUC1), se realizaron diversos intercambios de dominios, y finalmente se obtuvieron la clona pCA3 (CCA).

### VI. Análisis de la expresión de los genes reconstruidos

La expresión de las toxinas quiméricas se verificó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de los extractos totales de las cepas recombinantes. En los perfiles de proteínas no se observaron diferencias cuantitativas con respecto a la cepa de *E. coli* control (únicamente con el plásmido pUC19) sin los genes construidos. Las proteínas separadas en el gel fueron analizadas mediante inmunodetecciones, utilizando los anticuerpos policlonales anti $\text{cryIA}$ . De esta forma se pudo observar a cada una de las toxinas construidas como una banda de aproximadamente 60-70 kDa (Figura 14). En la Tabla 4 se muestran las características de las proteínas esperadas que se supone producen las clonas diseñadas, así como su genotipo  $\text{cry}$  característico.

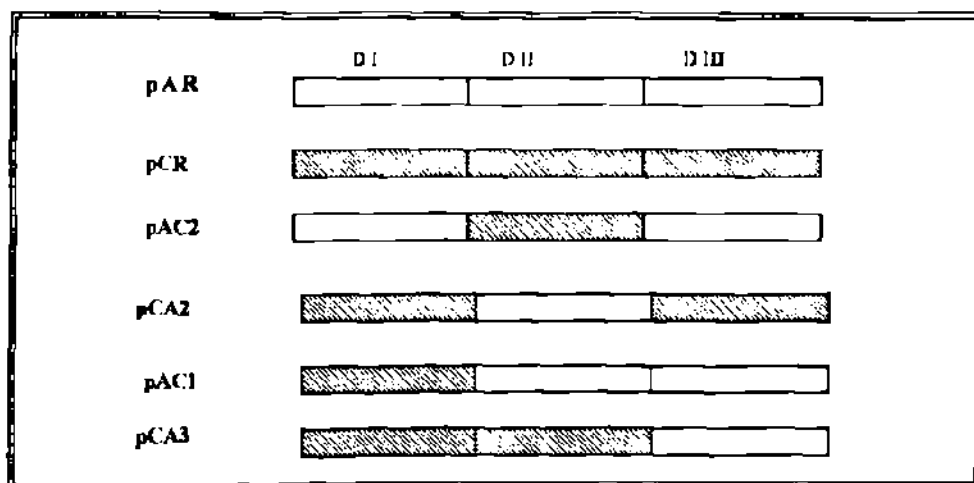


Figura 13. Construcciones genéticas resultantes de reconstruir los genes nativos con los sitios de restricción introducidos y de intercambiar los dominios entre ellos.



Tabla 4. Características de los plásmidos recombinantes reconstruidos y toxinas resultantes

Plásmido	Toxina	genotipo <i>cry</i>
HD-73		<i>cry</i> I Ac nativo
pES-1		<i>cry</i> I Aa
pUCD1-Aa		Domino I de <i>cry</i> I Aa
pUCD1-Ac		Domino I de <i>cry</i> I Ac
pAR	AAA	<i>cry</i> I Aa reconstruido
pCR	CCC	<i>cry</i> I Ac reconstruido
pAC2	ACA	DI de Aa - DII de Ac - DIII de Aa
pCA2	CAC	DI de Ac - DII de Aa - DIII de Ac
pAC1	CAA	DI de Ac - DII de Aa - DIII de Aa
pCA3	CCA	DI de Ac - DII de Ac - DIII de Aa

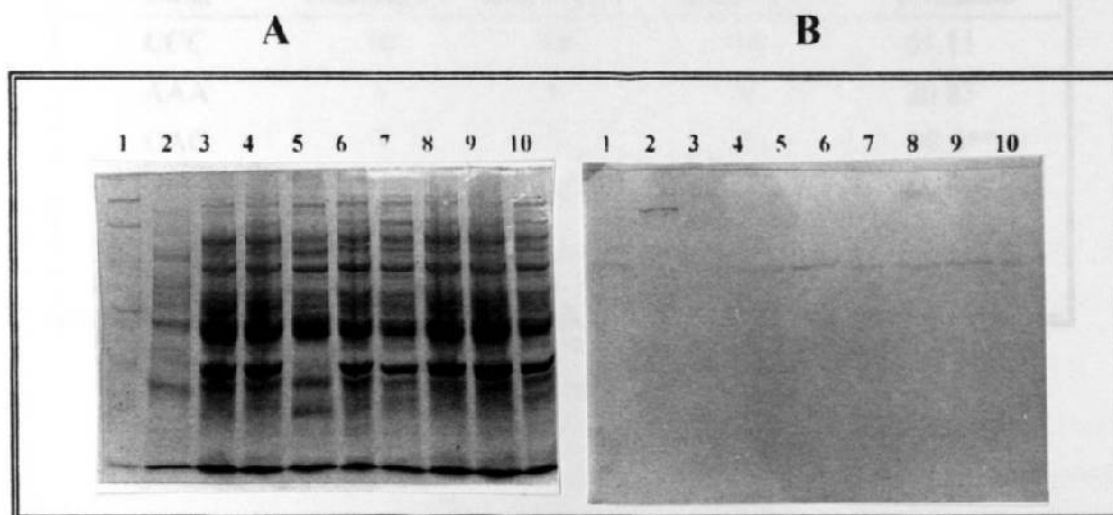


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetecciones de proteínas de los extractos totales de *E. coli* recombinantes. Panel A electroforesis de proteínas, carriles 1, Extracto de Bt HD73 con el cristal de CryI Ac, 2 al 5 *E. coli* con los plásmidos pUC19, pES1, pAR, pCR, pAC2 y pCA2, respectivamente; Panel B. Inmunodetección de las proteínas recombinantes. Carriles 1. Bt HD73, 2 al 5 extractos de *E. coli* en el mismo orden que el Panel A.

## VII.-Actividad biológica

En la Tabla 5 se muestran los resultados de los bioensayos realizados utilizando como insecto blanco *Trichoplusia ni*. Se observa una mayor actividad insecticida de CryI Ac subclonado, CCC, comparado con CryI Aa, AAA, en cuanto a porcentaje de mortalidad (61 y 20%, respectivamente); Con la toxina CAA se observó el mismo porcentaje de mortalidad que

con la toxina paterna (22%). Con CCA tampoco hubo diferencia significativa con respecto a su toxina de origen pues tuvo una mortalidad del 54.2%. Finalmente, se observó que CryIAc con el dominio II intercambiado CAC disminuyó su actividad con respecto a su proteína paterna pues tuvo una mortalidad del 30.56% y por lo contrario ACA que es CryIAa con el dominio II de CryIAc incremento su porcentaje de mortalidad con respecto a su proteína paterna. Los controles internos fueron larvas de *T. m* con extracto de *E. coli* con el plásmido pUC-19, que es el vehículo de clonación y CryIAc (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) purificada de la cepa de Bt HD-73 que tuvieron 0 y 100% de mortalidad respectivamente.

**Tabla 5.** Actividad insecticida de las toxinas quiméricas diseñadas contra *Trichoplusia ni*

Toxina*	bioensayo 1	bioensayo 2	bioensayo 3	% mortalidad promedio
CCC	16	14	14	61,11
AAA	6	5	4	20,83
CAC	7	7	8	30,5**
ACA	10	12	10	40,44**
CCA	13	12	14	54,2
CAA	6	5	5	22

\* Se utilizó una dosis de 10  $\mu$ g de proteína total por cm<sup>2</sup> de dieta.

\*\* diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a su proteína paterna

## DISCUSION

Las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son un grupo numeroso de proteínas estrechamente relacionadas que se utilizan comercialmente como insecticidas biológicos desde hace más de 50 años (Aronson 1986). Son sintetizadas durante la fase de esporulación de Bt y se depositan como cristales formados por una o más proteínas donde cada una puede desarrollar diferente especificidad insecticida (Lecadet *et al.*, 1988, Sanchis *et al.*, 1988). Cada tipo de toxina Cry tiene su propio espectro insecticida e incluye varios ordenes de insectos, incluso ahora phylas separados son considerados como susceptibles (Feithelson *et al.*, 1992).

Algunos grupos de investigación han concentrado sus esfuerzos para definir las regiones que determinan la especificidad de las toxinas CryIAa y CryIAc. Mediante intercambios recíprocos de secuencias en las regiones divergentes entre toxinas de diferentes especificidades produjeron híbridos activos con especificidades alteradas. De esta forma encontraron que la región importante para la especificidad hacia *Bombyx mori* en CryIAa se localiza entre los residuos 332-450 (Ge *et al.*, 1989); en CryIAc las regiones que dan la especificidad hacia *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* se localizan en los segmentos 332-450 y 332-612, respectivamente (Ge *et al.*, 1991).

Para conocer con mayor profundidad la relación estructura-función de las proteínas insecticidas es necesario relacionar los resultados obtenidos de modificaciones de genes con la estructura tridimensional de la toxina. Es por eso que la determinación de la estructura terciaria de la toxina Cry3A (Li *et al.*, 1991) y más recientemente la de CryIAa (Grochulsky *et al.*, 1995) constituyó un gran avance en este campo. Los dominios estructurales de CryIAa son los siguientes: el dominio I en el extremo amino terminal, que comprende del residuo 33 al 253, consta de siete estructuras  $\alpha$ -hélices y se asocia con la capacidad de formación de poro de la proteína; el dominio II se encuentra en la parte media de la molécula, va del residuo 265 al 461, está formado por tres láminas  $\beta$ -plegadas y se le atribuye el papel de reconocimiento del receptor en el intestino del insecto blanco, y el dominio III que abarca los residuos 463 al 609 en la región carboxilo terminal, también con estructuras  $\beta$ -plegadas, al parecer otorga la estabilidad a la proteína.



Al asociar los resultados obtenidos de modificaciones de genes con la estructura de la toxina se observa que la región involucrada en la determinación de la especificidad hacia *B. mori* y *T. ni* en CryIAa y CryIAc (residuos 332-450) es una parte del dominio II que incluye desde la lámina  $\beta$ -4 hasta la mitad de la  $\beta$ -11 y no comprende de este dominio a las láminas  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3 y 5 aminoácidos de la  $\beta$ -11 y la helice  $\alpha$ -8 donde hay un total de 8 aminoácidos no conservados. Por otra parte, la región que determina la especificidad hacia *H. virescens* (residuos 332-612) comprende desde la lámina  $\beta$ -4 del dominio II y abarca todo el dominio III. Esto demuestra que los segmentos intercambiados corresponden a regiones pequeñas que incluyen una porción de un dominio estructural o son tan grandes que abarcan hasta dos dominios estructurales, lo que dificulta asociar una función específica a un dominio en particular.

Por las observaciones anteriores, se consideró de gran interés, analizar la participación del dominio II íntegro sobre la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas. Con este propósito se delimitaron y subclonaron las regiones génicas que codifican para las toxinas CryIAa y CryIAc con sitios de restricción únicos para facilitar el intercambio del dominio II y probar el efecto de este reemplazo sobre la actividad biológica de las toxinas quiméricas resultantes.

Al iniciar este trabajo solamente se conocía la estructura tridimensional de Cry3A por lo que se procedió a alinear la secuencia de aminoácidos de esta toxina con las de CryIAa y CryIAc. Se encontraron regiones de alta homología entre los sitios que flanquean a los dominios y esto favoreció la delimitación de las proteínas CryIA con alto grado de confiabilidad. Los dominios de CryIAa quedaron definidos de la siguiente forma: El dominio I va del aminoácido 24 al 249, el dominio II del 258 al 454 y el dominio III del 462 al 607. Para CryIAc los dominios quedaron delimitados así: del 24 al 249, del 258 al 455 y del 463 al 609 para los dominios I, II y III respectivamente. A finales de 1995, Grochulsky y col. publicaron la estructura tridimensional de CryIAa informando que el dominio I comprende los residuos 34 al 250, el dominio II del 258-457 y el dominio III del 463-609, nuestros resultados coinciden con estas observaciones. El único cambio introducido en la secuencia primaria de nuestras construcciones es la adición de una glicina entre los residuos 251 y 252. Con la publicación de la estructura tridimensional se corrobora que esta región se encuentra en la

secuencia que conecta a los dominios I y II sin formar parte de algún dominio en particular, este resultado refuerza el diseño correcto de nuestras construcciones.

Con el propósito de introducir los sitios de restricción adecuados para delimitar los dominios, se analizaron las secuencias nucleotídicas de los genes *cryIAa* y *cryIAc*. Los sitios quedaron definidos desde el extremo 5' de la región que codifica para el dominio I al extremo 3' del dominio III por los sitios de restricción *Pst*I, *Bam*HI, *Bgl*II y *Kpn*I. Para crear estos sitios se utilizó la técnica de mutagénesis sitio-dirigida a través de PCR. Los segmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pUC19 para obtener los genes *cryIAa* y *cryIAc* con los dominios delimitados por sitios de restricción para producir los plásmidos pAR y pCR, que codifican para las proteínas AAA y CCC, respectivamente. También, se intercambió el dominio II entre estos plásmidos para obtener los genes quiméricos *cryIAa* con el dominio II de *cryIAc* (pAC2) y *cryIAc* con el dominio II de *cryIAa* (pCA2), que producen las toxinas ACA y CAC, respectivamente. Además, se intercambiaron los dominios I y III, se obtuvieron los plásmidos pAC1 y pCA3 que producen las toxinas CAA y CCA, que corresponden a *CryIAa* con el dominio I de *CryIAc* y *CryIAc* con el dominio III de *CryIAa*. Esta técnica fue propuesta primeramente por Cunhingham y col en 1989 y constituye una herramienta muy poderosa para analizar la función de las regiones proteicas mediante intercambio de regiones divergentes entre proteínas altamente homólogas

Una vez construidas las clonas diseñadas se verificó la expresión de las toxinas quiméricas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de los extractos totales de las cepas recombinantes. En los perfiles de proteínas totales no se observaron diferencias cuantitativas con respecto a la cepa de *E. coli* sin los genes construidos. Esto indica que las toxinas diseñadas no se expresan en grandes cantidades como en *B. thuringiensis*. Sin embargo, cuando las proteínas separadas en el gel se analizaron mediante la técnica de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales anticryIA se encontró que las toxinas construidas se expresan como una banda de aproximadamente 60-70 kDa. Este problema de pobre expresión de las proteínas Cry truncadas no es nuevo y se ha presentado en diversos trabajos en donde se obtiene alrededor del 1% de la proteína total contrastando con el 30% que se produce en Bt con la toxina nativa. Se han propuesto que la baja producción de las toxinas Cry manipuladas genéticamente, tiene dos posibles causas, o se expresan muy

débilmente en hospederos heterólogos o son muy susceptibles a hidrólisis por proteasas. La primer teoría ha sido ampliamente estudiada y se proponen que en mayor o menor medida los siguientes factores son determinantes en la producción de las toxinas Cry: el uso de diferentes promotores, terminadores de transcripción y traducción, así como el genotipo de la cepa receptora (Ge *et al.* 1990, Perevra-Alferez *et al.* 1996). El otro factor de gran importancia al tratar de expresar genes en hospederos heterólogos, es la sensibilidad a proteasas intracelulares que presentan los productos de dichos genes, esta sensibilidad generalmente se ve incrementada si los genes portan alteraciones estructurales tales como mutaciones y deleciones (Almond y Dean, 1993). en general la tasa más alta de producción se ha obtenido en cepas de *E. coli* con un sistema de proteasas disminuido (Ge *et al.*, 1990). En nuestro laboratorio, la producción de las toxinas se pudo incrementar al cambiar la cepa receptora *E. coli* DH5 $\alpha$  a la JM101, aunque ninguna de las características genotípicas reportadas representa una ventaja importante para la expresión de proteínas heterólogas (Vázquez-Juárez, 1997; Ge *et al.*, 1990).

Para analizar el papel que desempeñan los dominios se realizaron bioensayos con las toxinas construidas utilizando como insecto blanco larvas del primer instar de *T. ni.* Al correr los bioensayos se encontró que CryIAc reconstruido (CCC) es más tóxica que CryIAa reconstruido (AAA), ya que mostraron una mortalidad del 60% contra un 20%, respectivamente. Este resultado concuerda con lo descrito por Ge y col. (1991) que al intercambiar los primeros 330 aminoácidos (que corresponden al dominio I y parte del dominio II) de CryIAc con CryIAa, no observaron cambios en la especificidad de estas toxinas. Ya que el dominio I entre estas proteínas está altamente conservado, pues solo varía en tres aminoácidos, es de suponerse que no participa en la especificidad insecticida y nuestro resultado lo confirma. Como se indica en secciones anteriores, se han realizado numerosos estudios del dominio I encaminados a demostrar su participación en la formación de poro y sus resultados son muy alentadores.

Al cambiar el dominio III de CryIAc por el de CryIAa se produjo la toxina CCA cuyo porcentaje de mortalidad es ligeramente menor que su toxina paterna CCC; sin embargo este cambio no es significativo, lo que sugiere que no participa de manera significativa en la especificidad de CryIAc hacia el insecto blanco. Estos resultados concuerdan con los

publicados primeramente por Ge y col. en 1991 donde describen que no hubo alteraciones en la mortalidad hacia *T. ni* al intercambiar las regiones 428-450 ni 450-612 entre CryIAc y CryIAa, que corresponden a la lámina  $\beta$ -10 y  $\beta$ -11 del dominio II y la  $\beta$ -11 y todo el dominio III, respectivamente. A este dominio se le atribuye tradicionalmente el papel de proteger a la toxina contra la acción de proteasas, sin embargo, recientemente se ha demostrado que podría tener otras funciones como fue sugerido por Lee y col. (1995) quienes encontraron que al provocar mutaciones en las láminas  $\beta$ -17 del dominio III de CryIAc, se altera la unión a las vesículas de la microvellosidad intestinal de *T. dispar* por lo que proponen que este dominio también está involucrado en el reconocimiento al receptor, pero esto último no está muy claro.

El intercambio de los dominios II entre las proteínas construidas resultó en la creación de las toxinas ACA y CAC. CryIAa con el dominio II de CryIAc (ACA) es 20% más tóxica que CryIAa contra *T. ni*, este incremento podría atribuirse a que posee el dominio II de CryIAc; por su parte CryIAc con el dominio II de CryIAa, es decir CAC, fue 30% menos tóxica que su gen paterno, esta disminución podría atribuirse a que posee el dominio II de CryIAa. Como ya se ha descrito, el dominio II corresponde a la región de mayor variabilidad entre estas toxinas e intercambios de especificidades entre las proteínas Cry generalmente involucran este dominio. Los diversos trabajos del grupo del Dr. Dean claramente demuestran que esta región de alguna forma está involucrada en la especificidad insecticida de diversas  $\delta$ -endotoxinas CryIA (Ge *et al.*, 1989 y 1991, Lee *et al.*, 1992 y 1995; Lu *et al.*, 1994; Wu y Dean, 1996; Dean *et al.*, 1996), sin embargo en todos ellos se trabajó con construcciones genéticas que no tenían los dominios bien delimitados pues utilizaron sitios de restricción naturales para realizar los intercambios. Este trabajo es el primero en realizar el intercambio completo del dominio II sin involucrar a regiones del dominio III y confirma que el dominio II, al menos para *T. ni*, es el que confiere la especificidad en estas proteínas.

Finalmente, cabe señalar que con el arribo de la ingeniería genética en la década pasada se incrementó de manera significativa el conocimiento sobre el modo de acción de las proteínas Cry. En la actualidad, la mayoría del trabajo de investigación en este campo van dirigidos al aislamiento y caracterización de las proteínas receptoras intestinales del insecto, y a conocer la región estructural de la proteína que sería la responsable de la especificidad y actividad insecticida; ya que a través de la tecnología del DNA recombinante, se han logrado

grandes avances en la comprensión de las bases moleculares del modo de acción de las proteínas insecticidas, se cree que cada vez está más cerca la posibilidad de diseñar nuevas toxinas con mayor potencia o un espectro de acción incrementado

## CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados permiten derivar las siguientes conclusiones

- 1 - Se logró la delimitación adecuada de cada dominio de CryIAa y CryIAc al alinear correctamente la secuencia primaria de estas toxinas con la de Cry3A e introducir por mutagénesis sitio-dirigida nuevos sitios de restricción
- 2 - Con los sitios introducidos, se clonaron los genes que codifican para la fracción tóxica de CryIAa y CryIAc produciendo las toxinas AAA y CCC
- 3 - Se intercambiaron regiones genicas específicas entre los genes *cryIAa* y *cryIAc* para obtener proteínas quiméricas con los dominios intercambiados. Estas proteínas son ACA, CAC, CCA y CAA
- 5 - La toxina CAA que corresponde a CryIAa con el dominio I de CryIAc no modificó su actividad insecticida con respecto a su proteína paterna AAA, lo que sugiere que el dominio I no participa en la especificidad insecticida de esta toxina
- 6 - La toxina CCA que corresponde a CryIAc con el dominio III de CryIAa no alteró la actividad insecticida con respecto a CryIAc, lo que indica que esta región tampoco determina la especificidad insecticida de la toxina hacia *T. ni.*
- 7 - Al intercambiar el dominio II de CryIAc por el de CryIAa se obtuvo CAC disminuyó la actividad insecticida con respecto a su proteína paterna, por su parte CryIAa con el dominio II de CryIAc incrementó su actividad insecticida. Este resultado, con la característica de ser el único que intercambia solamente el dominio II, apoya a los trabajos anteriores que involucran al dominio II con la especificidad hacia el insecto blanco

## PERSPECTIVAS

Después de analizar las investigaciones realizadas para aclarar el modo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas, aunado a los resultados encontrados en este trabajo, se puede observar que en los últimos años se han logrado grandes avances en este campo, se espera que en el futuro las investigaciones avancen en los siguientes aspectos:

- 1.- Conocer con mayor profundidad los aspectos que regulan la expresión de las toxinas Cry en hospederos heterólogos.
- 2.- Analizar las causas por las que hay una baja producción de las toxinas truncadas, entre las que se pueden citar posibles plegamientos defectuosos que originen la acción de las proteasas del hospedero.
- 3.- Conocer mas acerca de las propiedades de las proteínas intestinales del insecto, receptores, que interaccionan con las toxinas de Bt.
- 4.- Entender con mayor detalle el tipo de interacciones  $\delta$ -endotoxina-receptor específico.

El avance en las areas anteriormente descritas, llevará a una mejor comprensión sobre la regulación de la expresión de las toxinas de Bt y de su modo de acción que redundarán en el diseño de nuevas toxinas mas potentes y/o con mayor espectro de acción insecticida.

## LITERATURA CITADA

- Adams, L.F., K.L. Brown y H.R. Whiteley. 1991. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J Bacteriol* 173: 3846-3854.
- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker y D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmids clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Agaisse, H.D. y D. Lereclus. 1994. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* CryIII A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *J Bacteriol* 176: 4734-4741.
- Agaisse, H. y D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol* 177: 6027-6032.
- Almond, B.D. y D.H. Dean. 1993. Structural stability of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin homolog-scanning mutants determined by susceptibility to proteases. *Appl. Environ. Microbiol* 59: 2442-2448.
- Aronson A.L, W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Aronson, A.L, E.-S. Han, W. McGaughey y D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 981-986.
- Aronson A.L, D. Wu y C. Zhang. 1994. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. En Prensa.



- Bravo, A.** 1997 Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains *J Bacteriol* **179**: 2793-2801
- Bravo, A., S. Jansens and M. Peferoen** 1992a Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J Invertebr Pathol* **60**: 237-246
- Bravo, A., K. Hendricky, S. Jansens y M. Peferoen.** 1992b. A immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes *J Invertebr. Pathol.* **60**: 247-253.
- Brizzard, B.L. y H.R. Whiteley** 1988 Nucleotide sequence of an additional Crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* *Nucl. Acids Res.* **16**: 2723-2724
- Brown, K.L.** 1993. Transcriptional regulation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. **thompsoni** crystal protein gene operon *J Bacteriol* **175**: 7951-7957
- Brown, K.L. y H.R. Whiteley** 1988 Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polimerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4166-4170.
- Brown, K.L. y H.R. Whiteley.** 1990 Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polimerase that transcribes from a crystal protein gene promotor. *J. Bacteriol.* **172**: 6682-6688.
- Brown, K.L. y H.R. Whiteley** 1992 Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J Bacteriol.* **174**: 549-557.
- Cármenes R.S., J.P. Freije, M.M. Molina y J.M. Martín.** 1989. Predict 7, a program for protein structure prediction *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**: 687-693.

- Cerón J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina and A. Bravo. 1994 PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis* Appl Environ Microbiol **60** 353-356
- Chen, X., A. Curtiss, E. Alcantara y D.H. Dean 1995 Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. J Biol Chem **270**: 6412-6419
- Chestukhina, G.G., L.I. Kostina, A.L. Makhailova, S.A. Tyurin, F.S. Klepikova y V.M. Stepanov. 1982. main features of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin molecular structure. Arch. Microbiol. **132** 159-162
- Chestukhina G.G., S.A. Tyurin, L.I. Kostina, A.L. Osterman , I.A. Zalunin, O.A. Kodova y V.M. Stepanov 1990. Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins' N-terminal domains J. Protein Chem. **9** 501-507.
- Chungjatupornchai, W., H. Höfte, J. Seurinck, C. Angsuthanasombat y M. Vaeck. 1988 Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. Eur. J. Biochem. **173** 9-16
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, C Gawron-Burke y D.H. Dean. 1995. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* *cry* genes, pl en Program and Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Society for Invertebrate Pathology, Bethesda, Md.
- De Barjac, H. y E. Frachon. 1990 Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. **35**: 233-240.
- Donovan W.P., C.C. Dankocsik, M.P. Gilbert, M.C. Gawron-Burke, R.G. Groat y B.C. Carlton. 1988a. Amino acid sequence and entomocidal activity on the P2 crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. **263**: 561-567.

- Donovan, W.P., J.M.Jr. González, M.P. Gilbert y C. Dankocsik.** 1988b Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. *Mol Gen Genet* 214: 365-372.
- Donovan, W.P., C.C. Dankocsik y M.P. Gilbert.** 1988c Molecular characterization of a gene encoding a 72-Kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *J Bacteriol* 170: 4732-4738.
- Edwards D.L., J. Payne y G.G. Soares** 1990 novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. U S Patent No 4,498,734.
- Emory, S.A., A. Bouvet y J.G. Belasco.** 1992 A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 6: 135-148.
- Feitelson, J.S. Payne, J. y L. Kim** 1992. *Bacillus thuringiensis*. *Insects and beyond* *Bio/Technology* 10: 271-275
- Foncerrada L. y K.E. Narva** 1995 *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 delta endotoxin. No publicado. En GeneBank (GenomeNet WWW server, 8 de Nov. de 1995).
- Gabriel C.J. y R.J. Cook** 1990 Biological control the need for a new scientific framework. *BioScience* 40: 204-207
- Gazit E. y Y. Shai.** 1993. Structural and functional characterization of the 5 segment of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Biochemistry* 32: 3429-3436.
- Ge, A.Z., R.M. Pfister y D.H. Dean.** 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene* 93: 49-54.
- Ge, A.Z., N.L. Shivarova and D.H. Dean** 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041.

- Ge. A.Z., D. Rivers, R. Milne y D.H. Dean. 1991 functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins Refinement of a *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c) J Biol. Chem. 266: 17954-17958.
- Gringorten, J.L., R.E. Milne, P.G. Fast, S.S. Sohi y K. Van Frankenhuyzen. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. J. Invertebr Pathol. 60: 47-52
- Grochulsky P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.L. Schwartz, R. Brousseau and M. Cygler 1995 *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal Structure and Channel formation J Mol Biol 254: 447-464
- Gupta, B.L., J.A.T. Dow, T.A. Hall y W.R. Harvey. 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* crystal protein insecticide on ions an electrogenic K<sup>+</sup> transporting epithellium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. J Cell. Sci 74: 137-152
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar 1988 Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis aizawai* IC1 entomocidal crystal protein gene Nucl. Acids Res. 16: 10927.
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar. 1987 Characterization of the toxicity and cytophatic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. Mol. Microbiol. 1: 59-66.
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar 1989 Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin. single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol. 208: 183-194.
- Haider., M. Z. y S. Mahmood. 1990. *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: Diversity of crystal proteins and its relatness to the toxicity spectrum. J. Basic. Microbiol. 4: 251-258.

- Herrnstadt, C., T.E. Gilroy, D.A. Sovieski, B.D. Bennet y F.J. Gaertner. 1987 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp *san diego*. *Gene* 57: 37-46.
- Higgins, D.G. y P.M. Sharp. 1988 Clustal a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244
- Hofmann, C. y P. Lüthy. 1986 Binding and activity of *Bacillus Thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* 146: 7-11
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansen and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insects midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7844-7848
- Höfte H.R., K. Anny, B. Lambert, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2536-2542
- Höfte, H., Seurinck, J., Houtven, A.V. y M. Vaeck. 1987 Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis* toxic against Coleoptera. *Nucleic Acids Res.* 15: 7183.
- Höfte H., J. VanRie, S. Jansens, A. Van Houtven, H. Vanderbruggen y M. Vaeck. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2010-2017
- Höfte H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

- Jaquet, F., R. Hüter y P. Lüthy. 1987 Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ Microbiol* **53**: 500-504
- Kawalek, M.D., S. Benjamin, H.L. Lee y S.S. Gill 1995 Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* supsp. *jegathesan*. *Appl. Environ Microbiol* **61** 2965-2969
- Knight, P.J.K., N. Crickmore y D.J. Ellar 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**: 429-436
- Knowles, B.H. 1994 Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**: 275-308
- Knowles B.H., and D.J. Ellar. 1987 Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* **924**: 509-518
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 681-685.
- Lecadet, M.M., V. Sanchis, G. Menou, P. Rabot, D. Lereclus, J. Chaufaux y D. Martouret. 1988. Identification of a  $\delta$ -endotoxin gene product specifically active against *Spodoptera littoralis* among proteolysed fractions of the insecticidal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2689-2698.
- Lee, M.K., R.E. Milne, A.Z. Ge y D.H. Dean. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* **267**: 3115-3121.
- Lee, M.K., B.A. Young y D.H. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry IA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **216**: 306-312.

- Li J., J. Carrol y D.J. Ellar 1991 Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**: 815-821
- Lorence-Quiñones A. y Quintero-Ramirez R 1996 Mecanismo molecular de acción de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En *Avances Recientes en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*. Editores Galán-Wong, L.J. C. Rodríguez-Padilla y H.A. Luna-Olvera Ed. por L. A. N. L. pp 63-114
- Lu, H., F. Rajamohan y D.H. Dean. 1994 Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol* **176**: 5554-5559
- Lüthy, P. y H.R. Ebersold 1981 *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: histopathology and molecular mode of action. En *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. Editor E.W. Davidson. Allenheld Osmun & Co., Totowa, N.J. p 235-242
- Messing, J. 1979. A multipurpose cloning-system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* **2**: 43
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, R. Scott-Jøkerst y R.L. Fuchs. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8930-8933.
- Martens, J.W.M., B. Visser, J.M. Vlak y D. Bosch. 1995. Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 482-487.
- Martinez-Ramírez A., S. González-Nebauer, B. Escriche y M.D. Real. 1994. Ligand blot identification of a *Manthuca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **120**: 782-787.
- Murzin, A.G. 1994. New protein folds. *Curr Opin Struct. Biol.* **4**: 441-449.

- Narva, K.E. y J. Fu 1994 Novel coleopteran-active toxins from *Bacillus thuringiensis*. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, liberado el 14 de Octubre de 1994)
- Narva, K.E., J.M. Payne, G.E. Schwab, L.A. Hickie, T. Galasan y A.J. Sick. 1991 Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes and genes encoding novel nematode-active toxins cloned from *Bacillus thuringiensis* isolates. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, liberado 14 de Oct 1994).
- Payne J.M., R. J. C. Cannon y A.L. Bagley 1992 Novel *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. PCT International Patent Application No. WO 92/19106
- Pereyra-Alfárez B. 1992 Clonación, caracterización y manipulación del gen que codifica para la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10 Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca Mor. Méx
- Pereyra-Alfárez, B., Jiménez-Salas Z. y R.C Vázquez-Juárez 1996 Biosíntesis de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. En Avances Recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis* Editores Galán-Wong, I.J., C. Rodríguez-Padilla y H.A Luna-Olvera Ed. por U.A.N.L. pp 199-207
- Perlack F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate y D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology 8: 937-942.
- Rajamohan, F., J.A. Cotrill, F. Gould y D.H. Dean. 1996. Role of domain II, loop 2 aa of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem. 271: 2390-2396.
- Rigby, S. 1991. Bt in Crop Protection, PJB Publ., Richmond, Surrey, UK.
- Rodríguez-Padilla C., L.J. Galán-Wong and R.S. Taméz-Guerra. 1993. Catálogo Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANI., FCB-UANL. Mty, N.L. Méx.



- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis 1989 Molecular cloning: a laboratory manual/ second edition Cold Spring Harbor N Y Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchis V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux y M.M. Lecadet. 1988 Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29 Mol. Microbiol. 2: 393-404
- Sangadala, S., F.S. Walters, I.H. English y M.J. Adang. 1994 A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and <sup>3</sup>H-RB-K efflux *in vitro* J Biol Chem 269: 10088-10092
- Schnepf, H.E., K. Tomczak, J. Paz-Ortega y H.R. Whiteley 1990 Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. J Biol. Chem. 265: 20923-20930
- Schnepf H.E. and H.R. Whiteley 1981 Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 2893-2897
- Schnepf, H.E., Wong, H.C. y H.R. Whiteley 1985 The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260: 6264-6272.
- Sekar, V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland y M.J. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* avr tenabrionis Proc. Natl Acad. Sci. USA. 84: 7036-7040.
- Shevelev A.B., M.A. Svarinsky, A.I. Karasin, Y.N. Kogan, G.G. Chestukhina y V.M. Stapanov. 1993. Primary structure of the CryX- the novel delta-endotoxin- related gene from *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*. FEBS Lett. 336: 79-82.

**Smith G.P., and D.J. Ellar** 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem J.* **302**: 611-616.

**Smulevitch S.V., A.L. Osterman, A.V. Shevelev, S.V. Kaluger, A.L. Karasin, R.M. Kadyrov, O.P. Zagnitko, G.G. Chestukhina y V.M. Stepanov.** 1991. Nucleotide sequence of a novel delta-endotoxin gene CryIG of *Bacillus thuringiensis* ssp *galleriae*. *FEBS Lett.* **293**: 25-28

**Taylor, R., J. Tippett., G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan y S. Ely** 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* **6**: 1211-1217.

**Thompson M. y F.H. Gaertner** 1991. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent Application, No. Publication 0 461 799 A3.

**Thorne L., F. Garduño, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A.M. Walfield y T.J. Pollock.** 1986. Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". *J. Bacteriol.* **166**: 801-811

**Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y Van Mellaert.** 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Eur. J. Biochem.* **186**: 239-247.

**Vazquez-Juarez, R.C.** 1997. Producción de proteínas Cry truncadas en *Escherichia coli* y algunos factores que afectan su expresión. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, N.L. México

**Von Tersch, M.A., S.L. Slatin, C.A. Kulesza y L.H. English.** 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3711-3717.

- Wabiko H., G.A. Held y A. Bulla Jr 1985 Only part of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp berliner 1715 is necessary for insecticidal activity. Appl. Environ. Microbiol **49** 706-708
- Walters, F.S., S.L. Slatin, C.A. Kulesza y L.H. English 1991 Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. Biochem Biophys Res. Comm. **196**: 921-926.
- Ward, E.S. y D.J. Ellar 1987 Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var israelensis gene encoding 130 kDa delta-endotoxin. Nucl. Acids Res **15**: 7195
- Widner W.R. y H.R. Whiteley 1989 Two highly related insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki possess different host range specificities. J. Bacteriol **171** 965-974
- Widner W.R. y H.R. Whiteley 1990 Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran- dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. **172**: 2826-2832.
- Wong, H.C. y S. Chang. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. Proc Natl Acad. Sci USA **83**: 3233-3237
- Wong, H.C., H.E. Schnepf y H.R. Whiteley. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. **258**: 1960-1967.
- Wu, D. y A.L. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. J. Biol. Chem. **267**: 2311-2317.
- Wu, S.J. y D.H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII $\delta$  endotoxin. J. Mol. Biol. **255**: 628-640.

**Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing** 1985 Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-

**Zar J.H.** 1974 *Biostatistical Analysis* Ed Prentice-Hall Inc Englewood Cliff, N.J p 151-155

## APÉNDICES

Upman-Pearson Protein Alignment

kTupie: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>1176)	Seq2(1>645)	Similarity	Gap	Gap	Consensus	
New PROTAA.AS	New PROT3A.AS	Index	Number	Length	Length	
(27>607)	(54>644)	32.5	12	26	594	
	v30	v40	v50	v60	v70	v80
New PROTAA.AS	ERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGI <sup>^</sup> FGPSQWD <sup>^</sup> AFFVQIEQLINQ					
	:   :   : :   : :   : : : :   : : : :     :         :   :   :					
New PROT3A.AS	DVIQKGISVVGDLLGVVGFPPFGAL--VSFYTNFLNTIWPSEDP--WKAFMEQVEALMDQ					
	^70	^80	^90	^100	^110	
	v90	v100	v110	v120	v130	v140
New PROTAA.AS	RIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADP---TNPALREEMRIQFNDMNSALTT					
	:   : :   :   :   : :         :   : : : :   :     : :   :   :   :					
New PROT3A.AS	KIADYAKNKALAE <sup>^</sup> LQGLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQAESHFRN					
	^120	^130	^140	^150	^160	^170
	v150	v160	v170	v180	v190	v200
New PROTAA.AS	AIPLLAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVS <sup>^</sup> VFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNY					
	: :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :					
New PROT3A.AS	SMPSFAISGYEVLFLTTYAQAANIHLFLLKDAQIYGE <sup>^</sup> EWGYEKEDIAEFYKRQLKLTQEY					
	^180	^190	^200	^210	^220	^230
	v210	v220	v230	v240	v250	v260
New PROTAA.AS	TDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWRYNQFRRELTLTVLDIVALFSNYDSRRYP <sup>^</sup> IRTVSQ					
	: : : :     : : : :     : : : :     : : : :     : : :					
New PROT3A.AS	TDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESW <sup>^</sup> NFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYPK <sup>^</sup> EVKTEL					
	^240	^250	^260	^270	^280	^290
	v270	v280	v290	v300	v310	
New PROTAA.AS	TREIYTNPVLENFD-GSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDILNSIT <sup>^</sup> IYTDVHR-----GFNTW					
	: :   :   : :   : : : :   : :     :             :   :   :   :   :   :					
New PROT3A.AS	TRDVLTDPIVGVN <sup>^</sup> NLRGYGTTF <sup>^</sup> SNIE <sup>^</sup> NYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYGNDSFN <sup>^</sup> YTW					
	^300	^310	^320	^330	^340	^350
	v320	v330	v340	v350	v360	v370
New PROTAA.AS	SGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPN					
	: : :       : :   : :   : : :   : :   : : : :   : : : :   : : : :					
New PROT3A.AS	SGNYVSTRPSIGSNDIITS <sup>^</sup> PFYGNKSSEP <sup>^</sup> VQNL-EFN <sup>^</sup> GK <sup>^</sup> VYRAVANT---NLAVWPSAV					
	^360	^370	^380	^390	^400	^410
	v380	v390	v400	v410	v420	v430
New PROTAA.AS	NQELFVL <sup>^</sup> DGTEFSFASLT <sup>^</sup> TNLP <sup>^</sup> S-TIYRQRGTV--DSL <sup>^</sup> DVIPPQ <sup>^</sup> DN <sup>^</sup> SVPPRAGFS <sup>^</sup> HRLSH					
	: : : : : : : : : :   :					
New PROT3A.AS	YSGVTKVEFSQYNDQ <sup>^</sup> TDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPET <sup>^</sup> TDEPLEKGYSHQLNY					
	^420	^430	^440	^450	^460	^470
	v440	v450	v460	v470	v480	v490
New PROTAA.AS	VTMLSQAAGAVYTLRAPTF <sup>^</sup> SWQHRSAGFN <sup>^</sup> NIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGT <sup>^</sup> SVVKGP <sup>^</sup> GF					
	:   :   : :     :					
New PROT3A.AS	V-MCFLMQGSRGTI--PVL <sup>^</sup> TW <sup>^</sup> THK <sup>^</sup> SVDF <sup>^</sup> NMIDSKK <sup>^</sup> ITQLPLV <sup>^</sup> KAY <sup>^</sup> KLQSGASV <sup>^</sup> VAG <sup>^</sup> PRF					
	^480	^490	^500	^510	^520	^530

Upman-Pearson Protein Alignment

Clustal: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>1176)	Seq2(1>645)	Similarity	Gap	Gap	Consensus	
New PROTAA.AS	New PROT3A.AS	index	Number	Length	Length	
27>607)	(64>644)	32.5	12	26	594	
	v500	v510	v520	v530	v540	v550
New PROTAA.AS	TGGDILRRTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNFSAT					
	: :     :     . . . :   :   .   :     : : :     :      :        .					
New PROT3A.AS	TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYYFDKT					
	^540	^550	^560	^570	^580	^590
	v560	v570	v580	v590	v600	
New PROTAA.AS	MSSGSNLQSGSFRTVGFITPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAE					
	: :   . .   .    . . :   :    : :   : : : : . : :   :      :     :   . :					
New PROT3A.AS	INKGDTLTYNSFNLASFSTPFELS--GNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN					
	^600	^610	^620	^630	^640	









APENDICE B

Estabilidad de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR para el DNA del gen cry1Aa. Este análisis se realizó con el programa Amplify. Primer= oligonucleótido, Primability of match = Fuerza del apareamiento, Stability of match = estabilidad del apareamiento

Primer: bp7

-----  
 Primability of Match = 93%  
 Stability of Match = 45%

```

      5_                               3_
      TTTAGTCTGCAGTTAGTTGCACCTTGTGC
      | | | | | | | | | | | | | | | |
caccctgggtcaaaaattgatatttagtaaaattagttgcactttgtgcattttttcataagatgagtca
      |                               |
      397                             425
    
```

Primer: zj2

-----  
 Primability of Match = 93%  
 Stability of Match = 42%

```

      1262                             1290
      |                               |
ctgtattagatatcgttgctctattctcaaaattatgatagtcgaaggtatccaattcgaacagtttccca
      | | | | | | | | | | | | | | | |
      CTATTCICAAATTATGATGGATCCCGAAG
      3                               5
    
```

Primer: zj1

-----  
 Primability of Match = 88%  
 Stability of Match = 47%

```

      5_                               3_
      CCTATGATGGATCCCGAAGGTATCC
      | | | | | | | | | | | | | | | |
ttagatatcgttgctctattctcaaaattatgatagtcgaaggtatccaattcgaacagtttcccaattaa
      |                               |
      1269                             1293
    
```

Primer: zj4

-----  
 Primability of Match = 96%  
 Stability of Match = 61%

```

      1878                             1905
      |                               |
tttacacattgagagctccaaagcttttcttggcagcatcgcaagtgtgaatttaataatataattccttc
      | | | | | | | | | | | | | | | |
      CGTTTCTTGGCAGCATAGATCTGCTGC
      3                               5
    
```

Primer: zj3

-----  
 Primability of Match = 97%  
 Stability of Match = 54%

```

                5_                               3_
                CAGCATAGATCTGCTGAATTTAATAAT
                ||||| | |||||
agagctccaacgttttcttggcagcatcgcagtgctgaatttaataatataattccttcatacacaatta
                |                               |
                1889                           1915
    
```

---

Primer: zj5

-----  
 Primability of Match = 100%  
 Stability of Match = 72%

```

                2681                           2707
                |                               |
gacqtattcaaaqagaattacgttacgctattgggtacctcttgatgagtgcctatccaacgtatttatatc
                ||||| | |||||
                GTTACGCTATTGGGTACCTTTGATGAG
                3                               5
    
```

---

□

Estabilidad de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR para el DNA del gen cryIAc.

Primer: bp7

-----  
 Primability of Match = 93%  
 Stability of Match = 44%

```

                    5_                               3_
                    TTTAGTCTCCAGTTAGTTGCACTTTGTGC
                    | | | | | | | | | | | | | | | |
acaccctgggtcaaaaattgatatttagtaaaaattagttgcactttgtgcattttttcataagatgag
tc
                    |                               |
                    257                           286
    
```

---

Primer: zj7

-----  
 Primability of Match = 94%  
 Stability of Match = 51%

```

                    1123                               1151
                    |                               |
ctgtattagatategttgctctgttcccgaattatgatagtagagaagatatccaattcgaacagtttcc
ca
                    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
                    CTGTTCCCGAATTATGATGGATCCAGAAG
                    3_                               5_
    
```

---

Primer: zj6

-----  
 Primability of Match = 88%  
 Stability of Match = 43%

```

                    5_                               3_
                    CCTATGATGGATCCAGAAGATATCC
                    | | | | | | | | | | | | | | | |
ttagatatcgttgcctctgttcccgaattatgatagtagagaagatatccaattcgaacagtttccaatt
                    |                               |
                    1130                           1154
    
```

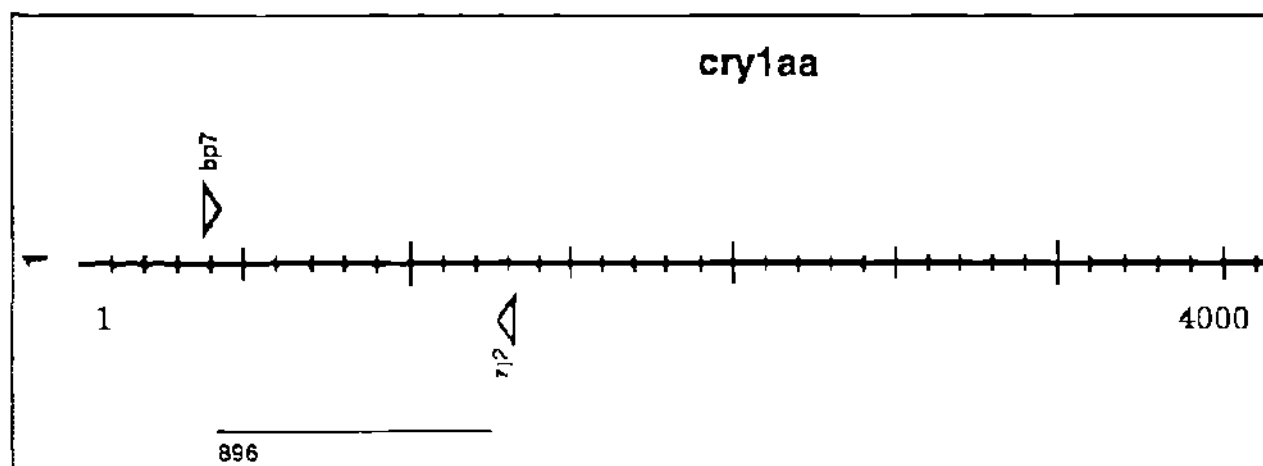


## APÉNDICE C

Amplificaciones teóricas del gen *cry1Aa*. Estos análisis se realizaron con el programa Amplify para mostrar la selectividad de los oligonucleótidos diseñados, las regiones donde se alinean y el tamaño del producto amplificado.

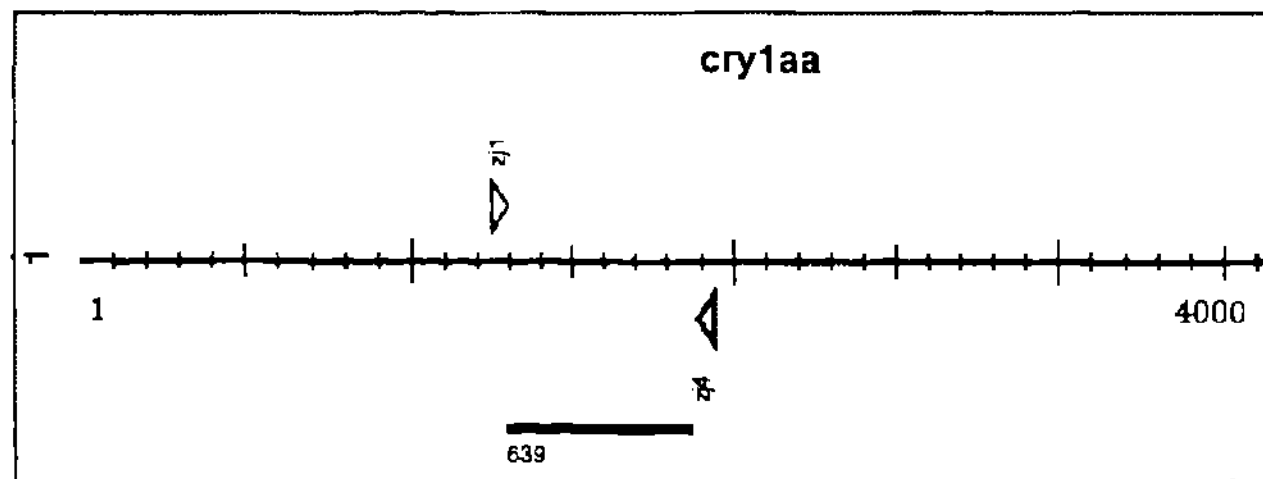
### AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO I DE *cry1Aa*

El producto formado es de 896 pares de bases.



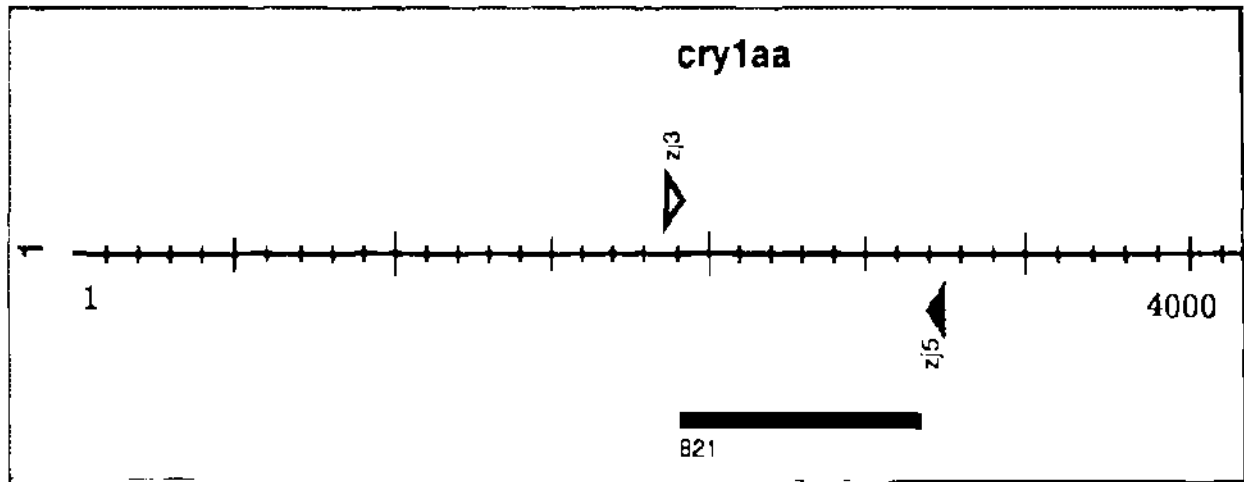
### AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO II

El producto formado es de 639 pares de bases.



### AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO III

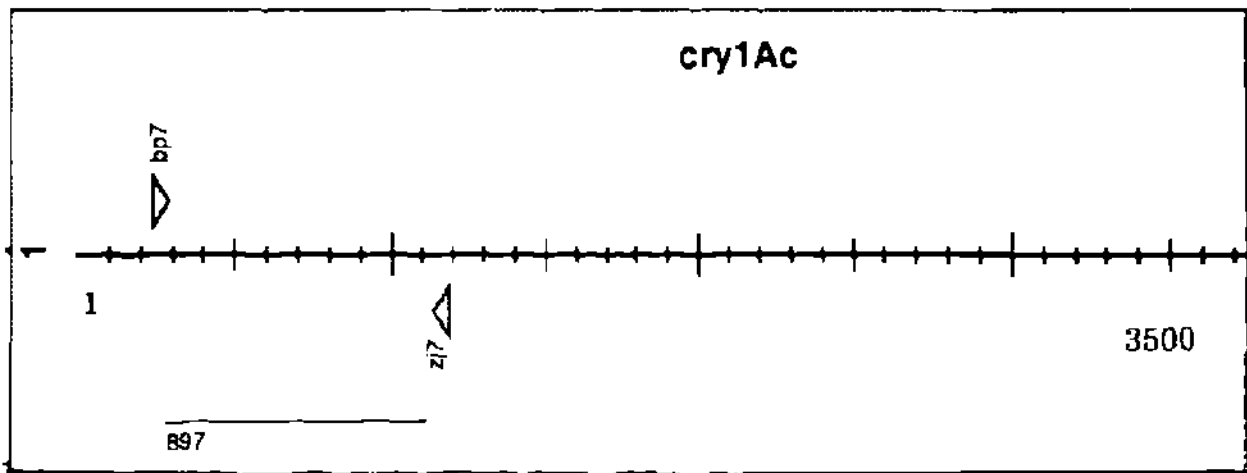
El producto formado es de 821 pares de bases



Amplificaciones teóricas del gen *cry1Ac*. Estos análisis se realizaron con el programa Amplify para mostrar la selectividad de las secuencias diseñadas, las regiones donde se alinean y el tamaño del producto amplificado.

### AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO I DE *cry1Ac*

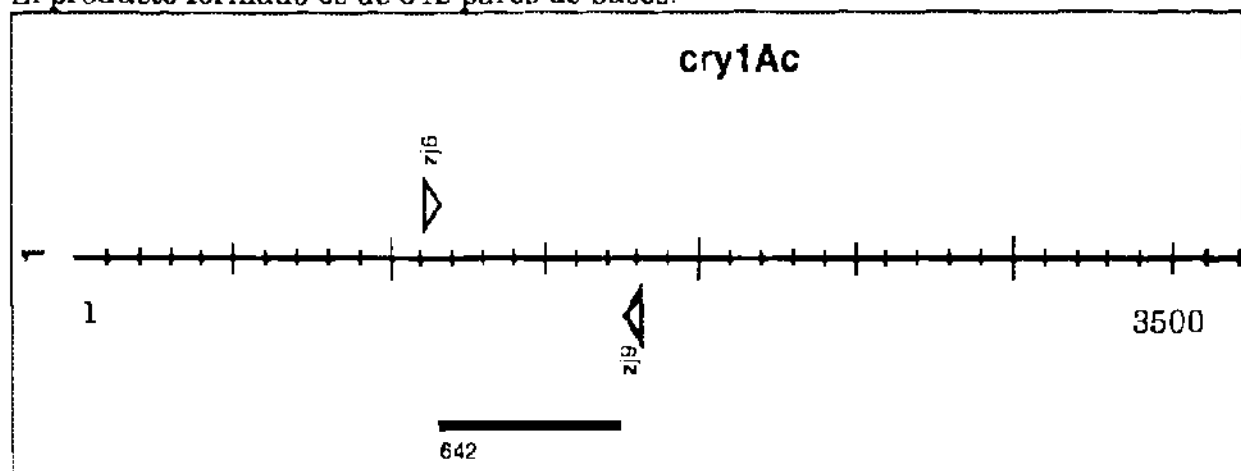
El producto formado es de 897 pares de bases.



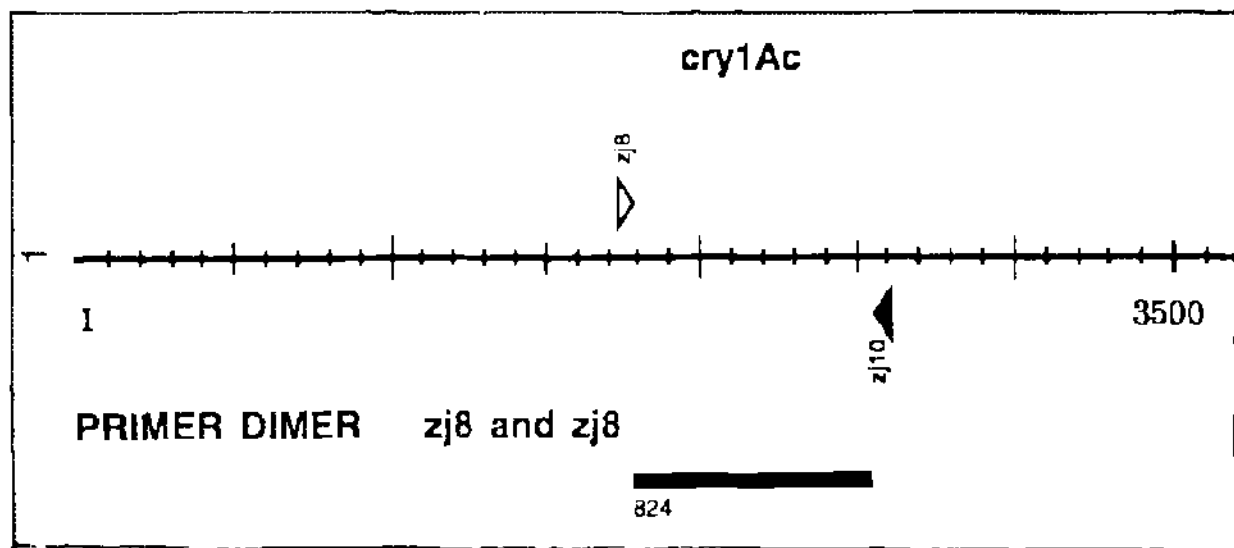


AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO II DE *cry1Ac*

El producto formado es de 642 pares de bases.

AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO III DE *cry1Ac*

El producto amplificado es de 824 pares de bases



**Técnicas más comunes de biología molecular (Tomadas de Sambrook, *et al.*, 1989).**

**D. Transformación de *E. coli* por el método químico con CaCl**

**D1. Preparación de células "competentes":**

1.-De un cultivo puro de *E. coli*, tomar una asada e inocular un matraz Erlenmeyer (de 250 ml) que contenga 50 ml de caldo LB e incubarlo durante 16-20 h en agitación constante a 200 rpm a una temperatura de 37°C

2.-A partir de este cultivo tomar 500  $\mu$ l y transferirlos a otro matraz de 250 ml que contenga 50 ml de caldo LB e incubarlo durante 3 h a 37°C en agitación constante a 200 rpm.

3.-Transferir el cultivo a dos tubos de polipropileno de 35 ml para centrifuga y colocarlos en hielo durante 10 min

**Nota:** Mantener las células en baño de hielo durante el mayor tiempo posible a lo largo de su preparación

4.-Centrifugar los tubos a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C

5.-Decantar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el paquete celular de los dos tubos en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M estéril y frío

6.-Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 min a 4°C

7.-Decantar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M estéril y frío

8.-Almacenar la suspensión de células competentes a 4°C durante 12-24 h.

## D.2. Transformación de *E. coli*:

- 1.-Con una micropipeta y usando puntillas estériles y frías, transferir 200  $\mu$ l de células competentes a tubos eppendorf de 1.5 ml también fríos y estériles. Agregar 5  $\mu$ l del DNA con el que se desea transformar (aproximadamente 10-50 ng) y mezclar muy suavemente con la micropipeta
- 2.-Colocar el tubo en hielo durante 30 min  
  
**Nota:** Se deben incluir controles de células competentes que reciban plásmido superenrollado y células que no reciban DNA alguno, con el fin de determinar la eficiencia y viabilidad de las células competentes preparadas
- 3.-Colocar los tubos en un baño de agua a 42°C durante 90 seg. Es muy importante que la temperatura y el tiempo sean exactamente los indicados ya que este punto es crucial para la toma de DNA por parte de las células
- 4.-Colocar los tubos en hielo durante 1 o 2 min
- 5.-Agregar 800  $\mu$ l de caldo SOC a cada tubo y transferir el volumen total a tubos de ensaye (13 x 100 mm) estériles e incubar a 37°C durante 45 min en agitación constante a 200 rpm
- 6.-A partir de cada tubo inocular cajas con agar LB con ampicilina (o con el medio selectivo adecuado) con 200  $\mu$ l de la suspensión celular (para un total de 5 cajas) y extender usando un asa de vidrio
- 7.-Incubar las cajas a 37°C durante no más de 18 h para evitar la aparición de colonias satélites alrededor de las colonias transformadas.
- 8.-Con palillos estériles, tomar las colonias y sembrarlas ordenadamente (usando una plantilla numerada) en cajas con agar LB con ampicilina (si se desean purificar los plásmidos, inocular simultáneamente tubos de ensaye con 3 ml de caldo LB con ampicilina), incubarlas toda la noche a 37°C y después almacenarlas a 4°C.

**E. Extracción de plásmidos a pequeña escala**

- 1.-Inocular una asda del cultivo que contenga el plásmido de interés en tubos de ensaye (13 x 100 mm) con 3 ml de caldo I B con ampicilina e incubar a 37°C durante 16-18 h en agitación constante a 200 rpm
- 2.-Cosechar las células centrifugandolas dos veces en tubos eppendorf de 1.5 ml a 10 000 rpm por 1 min en una microcentrifuga. Eliminar el sobrenadante en cada centrifugación
- 3.-Lavar las células en 1 ml de solución I fría, agitando vigorosamente en el vortex
- 4.-Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min en una microcentrifuga y decantar el sobrenadante
- 5.-Resuspender las células en 300  $\mu$ l de solución I fría con 2  $\mu$ l de RNAasa pancreática bovina (10 mg/ml, Sigma Chemical Co ), agitándolas en el vortex.
- 6.-Agregar 200  $\mu$ l de solución II recién preparada y mezclar suavemente por inversión unas cinco veces (no usar vortex). Incubar 5 min a temperatura ambiente y 5 min en hielo.
- 7.-Adicionar 200  $\mu$ l de solución III fría y mezclar suavemente en el vortex. Incubar en hielo durante 40-60 min.
- 8.-Centrifugar en microcentrifuga a 12,000 rpm durante 10 min.
- 9.-Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- 10.-Centrifugar en microcentrifuga a 10 000 rpm durante 10 min.
- 11.-Decantar y agregar 1 ml de etanol al 70% frío (no agitar). Centrifugar en microcentrifuga a 10 000 rpm durante 5 min.
- 12.-Repetir el paso anterior.
- 13.-Eliminar el sobrenadante y secar en un desecador-concentrador giratorio (Savant) durante 20 min a temperatura alta.
- 14.-Resuspender el DNA plasmidico en 50  $\mu$ l de agua bidestilada y almacenar en congelación hasta su uso

## F. Purificación de plásmidos

- 1.-Aforar la solución de plásmidos a un volumen de 200  $\mu$ l con agua bidestilada y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 2.-Agregar 1 volumen de la solución Sevag (clorofoma:alcohol isoamílico, 24:1) y mezclar suavemente en el vortex hasta que se forme una emulsión opaca.
- 3.-Centrifugar a 12,000 rpm durante 7 min en una microcentrifuga.
- 4.-Con una micropipeta de 200  $\mu$ l. tomar la fase superior acuosa que contiene los plásmidos, evitando arrastrar los restos celulares que aparecen como una película blancuzca entre las dos fases. Depositar la fase superior en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo.
- 5.-Agregar 1 volumen de la solución Sevag a la fase acuosa recuperada y agitar suavemente en el vortex hasta formar una emulsión opaca.
- 6.-Centrifugar a 12,000 rpm durante 7 min en una microcentrifuga.
- 7.-Repetir los pasos del 4 al 6.
- 8.-Tomar la fase superior acuosa con una micropipeta y transferirla a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/25 del volumen recuperado de NaCl 5 M. Mezclar suavemente por inversión.
- 9.-Congelar en hielo seco durante 2 h ó toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 10.-Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min en una microcentrifuga.
- 11.-Eliminar el sobrenadante y adicionar 1 ml de etanol al 70% frío (no agitar).
- 12.-Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min en una microcentrifuga.
- 13.-Repetir los pasos 11 y 12.
- 14.-Eliminar el sobrenadante y secar en un desecador-concentrador giratorio (Savant) durante 20 min a temperatura alta.
- 15.-Resuspender los plásmidos en el volumen apropiado de agua nanopura estéril y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Generalmente la eficiencia de recuperación de plásmidos con esta técnica es de alrededor del 50%, por lo que se recomienda resuspender en la mitad del volumen original de la muestra.

## G. Transformación de *E. coli* por electroporación (electro-transformación)

### GI. Preparación de células competentes:

- 1.-De un cultivo puro de *E. coli*, tomar una asada e inocular un tubo de ensaye (13 x 100 mm) con 3 ml de caldo LB e incubarlo durante 16-20 h en agitación constante a 200 rpm a una temperatura de 37°C
- 2.-A partir de este cultivo, tomar 1 ml e inocular un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenga 100 ml de caldo LB e incubarlo a 37°C en agitación constante a 200 rpm hasta obtener una absorbancia de 0.5-0.7 (aproximadamente 3 h).
- 3.-Transferir el cultivo a tubos de polipropileno de 35 ml para centrifuga y colocarlos en hielo durante 20-30 min

**Nota:** Todo el material que se use en la preparación de las células competentes deberá estar previamente lavado con agua mQ (pipetas, probetas, matraces, tubos, etc.) También es muy importante mantener las células en baño de hielo durante el mayor tiempo posible a lo largo de su preparación

- 4.-Centrifugar los tubos a 4 000 rpm durante 15 min a 4°C y decantar cuidadosamente el sobrenadante
- 5.-Resuspender con agitación suave el paquete celular de los tubos en 100 ml de glicerol al 10% frío y repetir el paso 4
- 6.-Resuspender con agitación suave el paquete celular de los tubos en 50 ml de glicerol al 10% frío y repetir el paso 4
- 7.-Resuspender con agitación suave el paquete celular de los tubos en 2 ml de glicerol al 10% frío y repetir el paso 4
- 8.-Resuspender suavemente en un volumen final de 200-300  $\mu$ l de glicerol al 10% frío.
- 9.-Almacenar la suspensión de células competentes a -70°C hasta su uso (las células pueden mantenerse efectivas al menos durante seis meses bajo estas condiciones)

## G2. Transformación de *E. coli*

- 1.-Descongelar lentamente las células competentes a temperatura ambiente y colocarlas en hielo inmediatamente. También poner a enfriar las cubetas de electroporación y el portacubetas
- 2.-En un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y frío mezclar 40  $\mu$ l de la suspensión celular con 1 o 2  $\mu$ l de DNA plasmídico (el DNA deberá estar lo más libre de sales posible). Mezclar bien y colocar en hielo
- 3.-Establecer las condiciones del electroporador (BIO-RAD). Capacitancia: 25  $\mu$ F. Resistencia 200  $\Omega$ . Voltaje 2.50 kV para cubetas de 0.2 cm y 1.8 kV para cubetas de 0.1 cm
- 4.-Transferir la mezcla de ADN y células a la cubeta fría y sacudir para bajar hasta el fondo
- 5.-Rapidamente colocar la cubeta en el portacubetas y empujarlos hacia la cámara de pulsos
- 6.-Presionar los dos botones del Gene-Pulser (BIO-RAD) hasta oír un tono constante.
- 7.-Remover rápidamente la cubeta (colocarla en hielo) y agregarle 1 ml de caldo SOC y resuspender con la puntilla
- 8.-Transferir la suspensión de células a tubos de ensaye (13 x 100 mm) estériles e incubar durante 60 min a 37°C a 225 rpm de agitación
- 9.-A partir de cada tubo, inocular cajas con agar LB con ampicilina (o con el medio selectivo adecuado) con 200  $\mu$ l de la suspensión celular (para un total de 5 cajas) y extender usando un asa de vidrio
- 10.-Incubar las cajas a 37°C durante no más de 18 h para evitar la aparición de colonias satélites alrededor de las colonias transformadas.
- 11.-Con palillos estériles, tomar las colonias y sembrarlas ordenadamente (usando una plantilla numerada) en cajas con agar LB con ampicilina (si se desean purificar los plásmidos, inocular simultáneamente tubos de ensaye con 3 ml de caldo LB con ampicilina), incubarlas toda la noche a 37°C y después almacenarlas a 4°C

## H. Extracción de plásmidos a gran escala

1.-Inocular una asada de la cepa que contenga el plasmido de interés en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenga 50 ml de caldo I B con ampicilina e incubar a 37°C durante 16-18 h en agitación constante a 200 rpm

2.-Cosechar las células centrifugándolas en tubos de plástico de 50 ml (Falcon) a 4.000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor JA-10) Eliminar completamente el sobrenadante

3.-Resuspender el paquete celular en 1 ml de solución I fina agitando vigorosamente en el vortex.

4.-Adicionar 2 ml de solución II recién preparada y mezclar suavemente por inversión unas diez veces (no usar vortex). Incubar 5 min a temperatura ambiente y 5 min en hielo.

5.-Añadir 2 ml de solución III fina y mezclar suavemente en el vortex hasta que no se distingan dos fases líquidas (debe formarse un precipitado blanco) Incubar en hielo durante 20 min

6.-Centrifugar el lisado bacteriano a 4 000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor JA-10)

7.-Transferir el sobrenadante a otro tubo cuidando no arrastrar restos celulares y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.

8.-Centrifugar a 5 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor JA-10). Si se centrifuga a 4°C pueden precipitar las sales.

9.-Decantar cuidadosamente y colocar los tubos abiertos en posición invertida para que se escurran completamente las gotas de sobrenadante

10.-Lavar las paredes del tubo con etanol al 70% frío y colocarlo en posición invertida sobre papel secante hasta que se evapore completamente el etanol.

11.-Resuspender el DNA plasmidico en 1.5 ml de agua bidestilada y añadir 10 µl de RNAasa pancreática bovina (10 mg/ml, Sigma Chemical Co.) Incubar durante 15 min a 37°C y almacenar en congelación hasta su uso



## 1. Purificación de plásmidos por columna

- 1.-Colocar 5 g de agarosa (BIO-RAD) en 100 ml de buffer de columna y dejarla humectar durante toda la noche a 4 °C
- 2.-Montar la columna en pipetas de plástico de 10 ml cortadas a la mitad y previamente taponeadas en su parte inferior (en la punta de la pipeta) con fibra de vidrio. Para esto se adiciona lentamente la agarosa con una pipeta Pasteur procurando que no se formen burbujas y eluyendo buffer de columna para que se empaque bien la agarosa.
- 3.-Una vez que se ha montado la columna, colocar la suspensión de plásmidos y dejarla eluir hasta que entre completamente hacia la agarosa empaquetada. Inmediatamente después, adicionar constantemente buffer de columna, siempre evitando que se seque la agarosa.
- 4.-A partir de este momento tomar fracciones (alrededor de 20) de 250  $\mu$ l en tubos eppendorf de 1.5 ml
- 5.-A cada alícuota recuperada agregarle 500  $\mu$ l de buffer de columna y mezclar por inversión
- 6.-Leer absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta, usando una cubeta de cuarzo perfectamente limpia y seca. Registrar las lecturas
- 7.-Tomar los tubos donde se presentó la mayor absorbancia (pico de absorción) y a cada uno de ellos añadirle 1 volumen de isopropanol.
- 8.-Mezclar los tubos por inversión suave y dejarlos reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
- 9.-Centrifugar los tubos a 10.000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga y eliminar completamente el sobrenadante
- 10.-Agregarle a cada tubo 1 ml de etanol al 70% frío (no mezclar) y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga.
- 11.-Eliminar el sobrenadante y repetir el paso anterior
- 12.-Eliminar el sobrenadante y secar los tubos en un desecador-concentrador giratorio (Savant) durante 20 min a temperatura alta.
- 13.-Resuspender el DNA plasmídico de todos los tubos en un volumen apropiado de agua miliQ estéril y almacenar a -20°C hasta su uso. Generalmente la eficiencia de recuperación de plásmidos con esta técnica es de alrededor del 60-70%, por lo que se recomienda resuspender en dos tercios del volumen original de la muestra.

## **J. Electroforésis e inmunodetección de proteínas**

### **J1. Electroforésis:**

- 1.-En tubos eppendorf de 0.5 ml colocar 50  $\mu$ l de muestra (puede ser proteína total libre ó células intactas) y añadirles 1 volumen de la mezcla lítica
- 2.-Calentar a ebullición en baño con agua durante 5 min
- 3.-Preparar el molde para la polimerización de los geles de poliacrilamida según las indicaciones del fabricante
- 4.-Preparar la mezcla del gel de poliacrilamida al 8% (gel separador) y vaciarla al molde. Esperar el tiempo necesario hasta que polimerice (alrededor de 15-20 min).
- 5.-Preparar la mezcla del gel concentrador y vaciarla sobre el gel separador. Rapidamente, colocar los peines para que se formen los pozos en los geles y esperar a que polimerice (alrededor de 15-20 min)
- 6.-Una vez que polimerizo retirar cuidadosamente los peines y colocar los geles en la cámara de electroforésis y llenarla con buffer de electroforésis.
- 7.-Colocar un volumen apropiado (5-40  $\mu$ l) de las muestras obtenidas en los pasos 1 y 2 en cada uno de los pozos de los geles, usando una jeringa Hamilton, de manera que ambos geles queden con las mismas muestras en los mismos carriles.
- 8.-Conectar los cables alimentadores de corriente y correr la electroforésis a 10 mA para el gel concentrador y 20 mA para el gel separador hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) llegue al borde inferior del gel (de 2 a 3 horas).
- 9.-Apagar la fuente de poder y sacar los geles del molde. Al gel que se va a transferir colocarlo en buffer de transferencia y al que se va a teñir, colocarlo en una charola con solución de tinción.
- 10.-Teñir el gel durante 4 h. Después de eliminar la solución de tinción, agregar suficiente cantidad de solución de destinción hasta cubrir el gel.
- 11.-Dejar desteñir durante 20-30 min y eliminar la solución de destinción. Rehidratar los geles en agua bidestilada durante toda la noche.
- 12.-Eliminar el agua y colocar el gel entre dos piezas de papel celofán y dejarlo a temperatura ambiente hasta que se seque completamente.

**J2. Inmunodetección:**

- 1.-Colocar el gel, la membrana de nitrocelulosa y dos piezas de papel filtro en buffer de transferencia durante 10 min
- 2.-Poner una de las piezas de papel filtro en el portageles, agregar un poco de buffer de transferencia sobre su superficie y colocar cuidadosamente el gel
- 3.-Agregar un poco de buffer de transferencia sobre la superficie del gel y sobre éste, colocar la membrana de nitrocelulosa cuidando que no se formen burbujas entre el gel y la membrana
- 4.-Vaciar un poco de buffer de transferencia sobre la membrana de nitrocelulosa y colocar sobre ella la otra pieza de papel filtro
- 5.-Cerrar el portageles y colocarlo en la cámara de transferencia, previamente llena con buffer de transferencia
- 6.-Conectar los cables de la fuente de poder, asegurandose que la membrana de nitrocelulosa quede hacia el polo positivo. Correr la electro-transferencia a 250 mA durante toda la noche
- 7.-Apagar la fuente de poder y desmontar el portageles y lavar la membrana de nitrocelulosa con buffer TBS
- 8.-Sumergirla en Tween 20 al 0.05% en TBS durante 10 min, repetir el lavado y sumergirla en Tween 20 al 2% en TBS durante 10 min. Lavar con TBS hasta eliminar completamente el Tween
- 9.-Adicionar el primer anticuerpo hasta cubrir el filtro completamente e incubar 60 min a 30°C en agitación suave
- 10.-Retirar el anticuerpo y lavar dos veces con Tween 20 al 0.05% en TBS por 5 min.
- 11.-Adicionar el segundo anticuerpo e incubar durante 40-60 min a 30°C en agitación suave.
- 12.-Retirar el anticuerpo y lavar muy bien con TBS.
- 13.-Agregar la solución cromogénica recién preparada (BCIP/NBT) y agitar suavemente hasta la aparición de bandas color violeta.
- 14.-Lavar la membrana con agua bidestilada y colocarla entre dos piezas de papel secante.

## K. Medios de cultivo y soluciones

### K1. Medios de cultivo:

**Nota:** Todos los medios de cultivo se ajustan a pH 7.0 y se esterilizan en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 min

#### Caldo Luria-Bertani (LB)

Triptona	10.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
NaCl	10.0 g/l

#### Caldo SOC

Triptona	20.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
NaCl	0.5 g/l
MgCl <sub>2</sub> (2M)	5.0 ml
KCl (250 mM)	10.0 ml
Glucosa (1M)	20.0 ml

#### Agar L.B

Triptona	10.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
NaCl	10.0 g/l
Agar-agar	18.0 g/l

**K2. Soluciones:**

**Nota:** Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada en los volúmenes indicados. Los buffers Tris se ajustan a pH 8.0 a menos que se especifique lo contrario y se filtran en membranas millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  al igual que las soluciones marcadas con asterisco

**Buffer TAE 10X**

Tris-base	48.4 g/l
Acido Acético Glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml

**Buffer TBS 10X**

Tris-base	100 mM
NaCl	1.5M

**Buffer de Transferencia**

Tris-base	3 g/l
Glicina	14.4 g/l
Metanol Absoluto	200 ml
Agua Bidestilada	800 ml

**Buffer de electroforesis de proteínas 1X**

Tris-base	3.75 g/l
Glicina	18 g/l
SDS	1.25 g/l

**Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)**

Tris-base	181.5 g/l
-----------	-----------

**Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)**

Tris-base	121.1 g/l
-----------	-----------

**Buffer de Carga**

Azul de Bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol	30%

**Buffer de columna**

Tris-HCl 1 M (pH 8.0)	12.5 ml
NaCl 5 M	25 ml
NaN <sub>3</sub>	16.2 mg
Agua Bidestilada	212.5 ml

**Tween 20 al 2%**

Tween 20	2 ml
Buffer TBS	98 ml

**Tween 20 al 0.05%**

Tween 20 al 2% en TBS	2.5 ml
Buffer TBS	97.5 ml

**Solución Cromogénica (pH 9.5)**

Tris-base	0.36 g
NaCl	0.17 g
MgCl	0.30 g
BCIP	5 mg
NBT	10 mg
Agua Bidestilada	30 ml

**Solución de Tinción**

Azul Brillante R	2 g
Metanol	250 ml
Acido Acético	50 ml
Agua Bidestilada	200 ml

**Solución de Destinción**

Metanol	100 ml
Acido Acético	20 ml
Agua Bidestilada	80 ml

**Mezcla Lítica**

Buffer Tris 1 M (pH 6.8)	2.5 ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
2- $\beta$ -Mercaptoetanol	1 ml
Agua bidestilada	0.5 ml
Azul de Bromofenol	20 mg

**SDS al 10%**

SDS	10 g
Agua bidestilada	100 ml

**Persulfato de Amonio al 10%**

Persulfato de Amonio	10 g
Agua bidestilada	100 ml

**Etanol al 70%**

Etanol Absoluto	70 ml
Agua bidestilada	30 ml

**Solución de Ponceau S**

Ponceau S	2 g
Acido Tricloroacético	30 g
Acido Sulfosalicílico	30 g
Agua Bidestilada	100 ml

**Agarosa 1%**

Agarosa	1 g
Buffer TAE 1X	99 ml

**Acrilamida-Bisacrilamida 30%\***

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Agua Bidestilada	100 ml

**Glicerol al 10%**

Glicerol	10 ml
Agua Bidestilada	90 ml

**Solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M\***

CaCl <sub>2</sub>	111 g
Agua Bidestilada	100 ml

**Solución I**

Glucosa	50 mM
Tris-base	25 mM
EDTA	10 mM

**Solución II**

NaOH	0.2 N
SDS	1%

**Solución III**

Acetato de Potasio 5 M	60 ml
Acido Acético Glacial	11.5 ml
Agua Bidestilada	28.5 ml

**Solución Sevag**

Cloroformo	96 ml
Alcohol Isoamílico	4 ml

**Solución de NaCl 5M**

NaCl	29.2 g
Agua Bidestilada	100 ml

**Solución de NaOH 5N**

NaOH	20 g
Agua Bidestilada	100 ml



