

Artículos originales completos

Clonación y expresión de un gen quimérico de la toxina del *Bacillus thuringiensis* var. berliner por P.C.R.

G. DE LA RIVA, P. ORAMAS, B. GOYENECHEA y S. PÉREZ

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

Recibido en abril de 1989

Aprobado en mayo de 1989

RESUMEN

El *Bacillus thuringiensis* (Bt.) vars. berliner y kurstaki, se han usado ampliamente como pesticidas. Estas bacterias producen durante la fase de esporulación una toxina con fuerte actividad lepidopterica. Los genes que codifican para esas toxinas han sido clonados y expresados recientemente en plantas. Estas plantas transgénicas han mostrado toxicidad por ellas mismas contra los insectos.

La metodología conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (P.C.R.), muy recientemente desarrollada, permite la amplificación de un gen, usando la extensión del ADN por la ADN polimerasa a partir de iniciadores específicos.

Un gen truncado conteniendo las 2/3 partes del terminal NH₂ del gen original, fue aislado de una preparación de ADN total de esta bacteria usando P.C.R. Este gen quimérico fue acoplado directamente a un promotor inducible de *E. coli*. El producto del gen sintetizado en *E. coli* fue identificado por anticuerpos antitoxina y su actividad biológica fue testada usando larvas de *Heliothis virescens*. El análisis de la secuencia parcial del ADN muestra una alta homología con la secuencia reportada en la región 5', pero tiene una divergencia muy alta en la 3'.

ABSTRACT

B. thuringiensis (Bt.) vars. berliner and kurstaki have been widely used as pesticide. Some strains of these bacteria produce during sporulation an endotoxin very active against several families of Lepidoptera. The genes that codify for these toxins have been recently cloned and expressed in plants, these transgenic plants have shown toxicity by themselves against those insects.

Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) is a novel methodology that uses the DNA extension by polymerase from specific primers, complementary to both ends of the segment to be amplified.

The two third parts of the gene, that codify for the NH₂ terminal of the Bt. var berliner endotoxin, was isolated from a total DNA preparation of this bacterium, using P.C.R. technique. This chimaeric gene was directly coupled to an *E. coli* heat inducible promoter the gene product synthesized in *E. coli* was immunologically identified and its biological activity was assayed using *Heliothis virescens* larvae. DNA analysis shows a high DNA homology with the reported sequences in the 5' region but a high divergency in 3' end of this chimaeric gene.

INTRODUCCION

En la agricultura moderna el método más empleado para el control de plagas de insectos es el uso de insecticidas químicos. Estos, aparte de su elevado costo, tienen los inconvenientes de que pueden resultar tóxicos al hombre o a los animales, y se ha comprobado con muchos de ellos que los insectos crean resistencia después de su uso continuado. El control biológico de plagas ha existido de forma natural y el estudio sistemático de este equilibrio ha permitido abrir un campo relativamente nuevo, que se conoce como lucha biológica.

Los Lepidópteros forman un orden de insectos que constituyen plagas fundamentales para muchos cultivos; contra estos se ha venido empleando en varios países un método de control biológico a través de una bacteria entomopatógena del suelo, el *Bacillus thuringiensis*. Existen variedades de Bt. tóxicas a diferentes órdenes de insectos, así por ejemplo se han reportado variantes como: kurstaki, thuringiensis, berliner, soto, etc., tóxicas a plagas de Lepidópteros (Dulmage, 1981); var. tenebriones y San Diego, tóxicas a plagas de Coleópteros (Hernstadt *et al.*, 1986) y otras han sido tóxicas contra Dípteros (Goldberg y Mergolit, 1977).

Los mecanismos por los cuales el Bt. resulta tóxico a estos insectos, están determinado por la producción en esta bacteria durante la fase de esporulación de un polipéptido de alto peso molecular (oscila de acuerdo con la variedad entre 70 000 y 130 000 dalton), conocido como delta-endotoxina, que cristaliza formando unas estructuras morfológicamente bien caracterizadas llamadas cristales paraesporales. Estos cristales insolubles en soluciones acuosas, neutras o ácidas, se disuelven a pH alcalino dentro del intestino de las larvas de insectos, donde parcialmente se hidrolizan formando un péptido activo que produce parálisis intestinal y pérdidas de líquido a través de las paredes intestinales, causándoles una rápida inhibición de su voracidad y su posterior muerte. Está, además, profundamente comprobado, que esta toxina es completamente inocua al hombre y a otros mamíferos.

Si bien el uso de preparados bacterianos (en fase de esporulación) en el campo, representa en muchos casos un método muy efectivo para el control de estas plagas, este tiene, a la vez, algunos inconvenientes; el principal es que el tiempo de residencia de la forma activa en el campo es breve (sólo unos pocos días) pues es degradable por radiaciones solares de alta energía y es lavado fácilmente por la lluvia o regadío, por lo que su uso es efectivo solo si se aplica en los primeros momentos después de la detección de las plagas. Además, el costo puede ser tan elevado como los productos químicos, y en ocasiones más aún.

El propósito que ha motivado a los laboratorios a aplicar la ingeniería genética en las plantas, es introducir de forma estable y expresar el gen que codifica para la delta-endotoxina del Bt. en el genoma de las plantas, de tal manera que el cultivo produzca de forma natural la toxina que elimine al insecto desde los primeros momentos en que este se alimenta de la planta.

Actualmente varios laboratorios han logrado, mediante esta vía, la obtención de plantas transgénicas, tóxicas a Lepidópteros (Fischhoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987). La expresión de genes bacterianos en plantas necesita la construcción *in vitro* de genes híbridos donde se unan a las señales de inicio de transcripción propias y específicas de plantas, las regiones del gen bacteriano que codifica para la proteína madura.

En el caso específico del gen de la toxina del Bt. var. berliner se ha comprobado que la expresión del gen truncado desde el inicio ATG hasta las 2/3 partes del mismo, brinda una expresión mayor y por lo tanto aumenta la toxicidad por unidad de superficie de hoja (Vaeck *et al.*, 1987). Todo esto obliga a extensivas manipulaciones del gen antes de lograr una construcción con altos niveles de expresión.

Por otro lado, recientemente se ha venido desarrollando una técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.) (Salki *et al.*, 1986), la cual consiste en utilizar la facilidad de extensión de la cadena de ADN por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, usando oligonucleótidos complementarios a la cadena que se "copia" como inicia- dores (*primers*), para amplificar un segmento dentro de una preparación de ADN de alto peso.

En nuestro trabajo logramos la expresión de un gen quimérico de la toxina del Bt. en *E. coli*, en solo unos pocos pasos usando esta metodología.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

E. coli. Se usó la cepa MC1066 [F^+ , Del: $lacX74$, hsR^+ , hsM^+ , $rpsL$, $galK$, $tripC9030$, $leuB600$, $pyrF::tn5$] como receptora para ensayar la expresión de la toxina del Bt.

Se usaron los plásmidos pUC19 (Yanish-Perron *et al.*, 1986) y pCQV2 (Queen, 1983).

B. thuringiensis. Se utilizó la cepa de Bt. var. berliner aislada de preparaciones comerciales de insecticidas.

Purificación del ADN

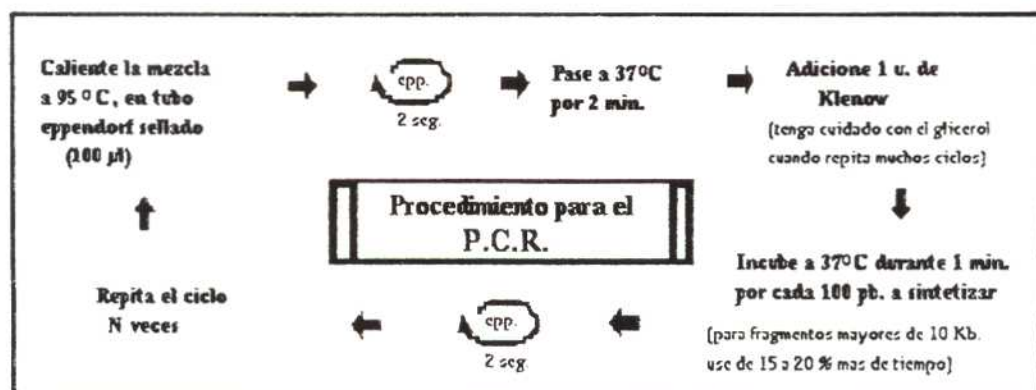
ADN total del Bt. de alto peso molecular fue purificado por el método reportado por Kronstad y Whiteley, 1983. Todos los plásmidos fueron obtenidos por el método alcalino de Birnboim y Dolly, 1979.

Reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.)

Las modificaciones al método de P.C.R., se realizaron a partir del procedimiento de Engelke D.R. *et al.*, 1988. Estas consistieron en:

1,5 μ g de ADN total de Bt. var. berliner se mezclaron con 0,5 nmoles de oligonucleótidos complementarios a cada extremo del segmento a amplificar y con 5 nM de cada nucleótido trifosfato, en 1X buffer Klenow (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 100 mM $MgCl_2$) en un volumen final de 100 μ l.

La mezcla se calentó 5 min a 95°C, se le dio un "golpe de centrifuga" y se colocó 3 min a 37°C. En ese momento se le adiciona la enzima (1 U de Klenow) y se incubó por 30 min a 37°C. Se le da un "golpe de centrifuga" y se comienza otro ciclo de desnaturalización y extensión adicionando 1 U de Klenow nueva en cada ciclo (figura 1); el número de ciclos depende del nivel de amplificación que se desee (figura 2).



$N = \frac{\ln [M_f (M_i \times F)]}{\ln (1+X)}$	<p>M_f número de μg del fragmento de ADN que se espera al final</p> <p>M_i μg de ADN inicial</p> <p>F Frecuencia del gen en la preparación de ADN inicial</p>	<p>X Eficiencia del ciclo de PCR (1 \rightarrow 0.5)</p>
--	--	--

FIG. 1. Esquema del procedimiento del P.C.R. La mezcla contenía: Un μ g de ADN total de Bt.; 10 nmoles de cada nucleótido; 0,5 nmoles de cada *primer* y 1X buffer Klenow.

FIG. 2. Expresión para el cálculo del número de ciclos necesarios en la amplificación por P.C.R. de un segmento dado.

Purificación de tóxina y producción de antisueros

La toxina fue purificada de los cuerpos paraesporales de *B. thuringiensis* var. berliner en fase de esporulación, haciendo pequeñas modificaciones del método reportado por Ibarra y Federici (1986), obteniéndose un preparado con dos poblaciones moleculares, una mayoritaria de 130 kD y otra de 65 kD, con una pureza mayor del 85%. Este preparado fue utilizado para la inoculación de un conejo en 5 dosis de 300 µg con adyuvante completo; el suero fue extraído y las inmunoglobulinas purificadas, obteniéndose un título de 1/5000; el título anti-*coli* residual fue eliminado enfrentándolo a una preparación de proteínas totales de *E. coli*.

Actividad biológica

Fue realizada usando larvas de *Heliothis virescens* en su primer instar. Para cada determinación se usaron 5 larvas aisladas, alimentadas con discos de hojas de tabaco fresco recubiertos con diferentes cantidades de toxina o lisados celulares de los clones en ensayo; los discos se reponen cada 24 horas, evaluándose el área ingerida y el estado de las larvas. En todos los casos la evaluación final de muerte se realizó a los 5 días.

Secuenciación

La secuenciación del gen se realizó usando el método de la interrupción específica de la extensión de la cadena usando dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 3 nos muestra el diseño de los oligonucleótidos usados para la amplificación del fragmento del gen de la toxina del Bt. usados para la construcción de los genes quiméricos. El oligo 5' presenta 15 pares de bases de homología con los nucleótidos que forman los primeros codones de la toxina, incluyendo el ATG y ocho nucleótidos adicionales a su 5' terminal para introducir un sitio BamHI; el oligo del otro extremo es complementario con los nucleótidos del 2116 al 2124 del gen del Bt. berliner reportado por Höfte *et al.*, 1986, e introduce en su terminal 3' dos codones de terminación consecutivos en fase y un sitio BamHI.

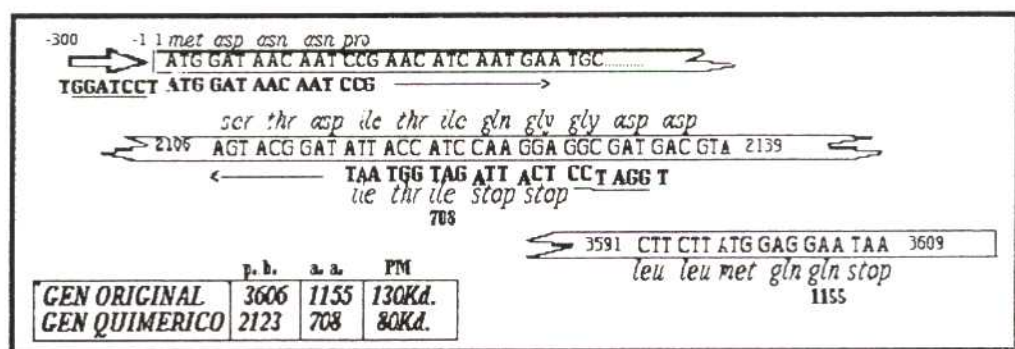


FIG. 3. Diseño de los oligonucleótidos usados para la amplificación por P.C.R. del gen quimérico de la δ -endotoxina del Bt. var. berliner.

Durante la amplificación se comprobó que a partir de 1 µg de ADN total, después del ciclo 17, la banda amplificada era perfectamente visible en agarosa (figura 4) cuando es aplicada una veinteva parte de la mezcla. Esto indica que la eficiencia promedio por ciclo fue de entre el 40 % y el 50 % aproximadamente, que es alta, de acuerdo con otros resultados del laboratorio cuando se utiliza esta metodología para amplificar segmentos a partir de preparaciones de ADN total (es decir, para frecuencias bajas del gen en la preparación inicial de ADN).

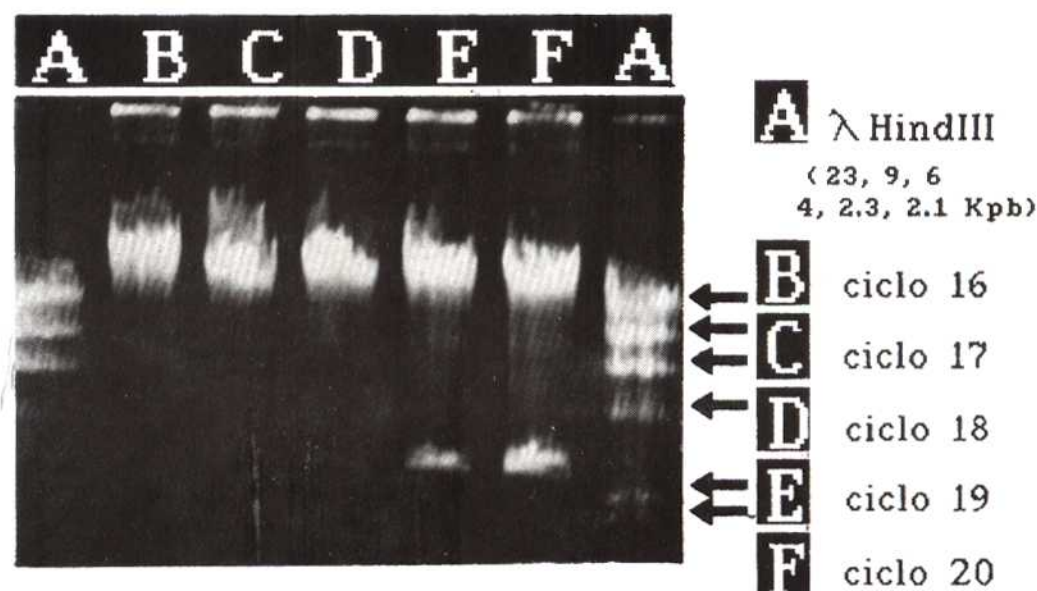


FIG. 4. Electroforesis en agarosa 0,8 % del resultado del P.C.R. después de los ciclos 16 al 20. Cinco μ l del total de 100 μ l iniciales se aplicaron en cada ciclo analizado.

La banda resultante de la amplificación preparativa fue separada del resto del ADN cromosomal por electroforesis en agarosa de baja temperatura de gelificación (LGT). La banda eluida se dirigió con la enzima BamHI y fue introducida en el plasmidio de expresión pCQV2 en el sitio Bam HI; las colonias recombinantes con el gen de Bt. en orientación correcta fueron inmuno-identificadas *in vitro* obteniéndose dos colonias que portaban plasmidios que por análisis de restricción mostraban un patrón similar (pBPCV3 y pBPCV4).

La cuantificación y caracterización de la proteína producida por estos clones fue realizada en electroforesis de proteínas totales de las bacterias inducidas y no inducidas. La figura 5 muestra una banda de peso molecular (PM) aproximado de 65 kD presente en los clones inducidos y ausente en los clones no inducidos o en el control del pCQV2. El PM del producto de la expresión del gen quimérico es inferior en 15 kD al esperado según la secuencia nucleotídica reportada. Esta diferencia pudiera estar relacionada con la presencia de proteasas en *E. coli*. Es conocido que preparaciones purificadas de la toxina natural tienen presente un componente menor, de aproximadamente 65 kD.; también se conoce que la degradación de la toxina por proteasas del intestino del insecto produce componentes de esta talla (Tojo, 1986).

Diferentes cantidades del lisado de proteínas totales de las cepas, inducidas y no inducidas, fueron inmovilizadas en filtros de nitrocelulosa, detectándose que el clon 4 de *E. coli* conteniendo el gen quimérico produce una proteína inducible reconocida por los anticuerpos anticristales de la toxina del Bt. (figura 6).

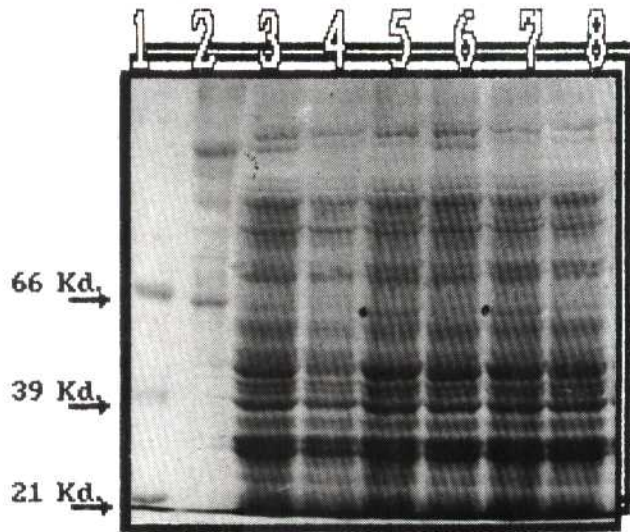


FIG. 5 Electroforesis en poliacrilamida -SDS 12 % de los lisados totales de las bacterias (*E. coli* MC1066) conteniendo las diferentes construcciones. La aplicación en cada pocillo equivale a 3 O.D. Las muestras se crecieron a 30°C a la densidad óptica de 1; las muestras inducidas se pasaron a 42°C en agitación por 3 horas más. 1) Patrón de pesos moleculares. 2) Toxina de Bt. purificada. 3) *E. coli* MC1066 con pCQV2. 4) *E. coli* MC1066 con pBPCV3 no inducido. 5) *E. coli* MC1066 con pBPCV3 inducido. 6) *E. coli* MC1066 con pBPCV4 no inducido. 7) *E. coli* MC1066 con pBPCV4 inducido. 8) *E. coli* MC1066 con pBPK₁₁ (clon conteniendo fragmento de 4,5 Kb. del gen de la toxina del Bt. Kurstaki).

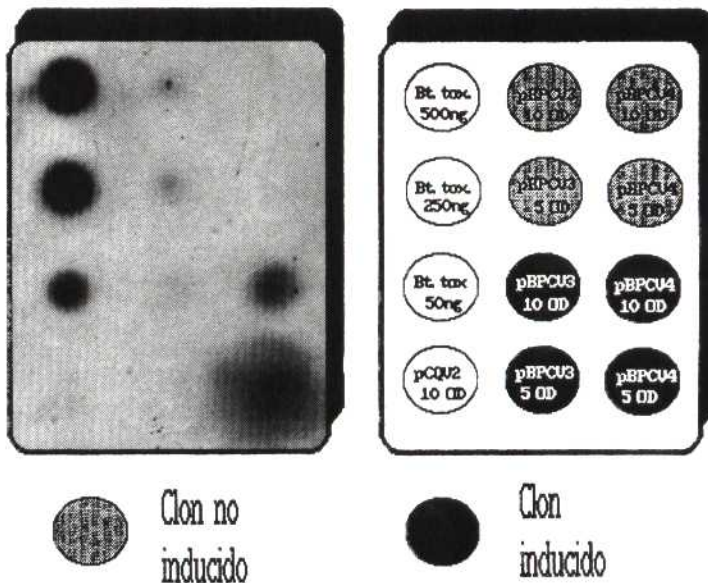


FIG. 6. Inmuno-dot del lisado de proteínas totales de los clones de *E. coli* inducidos y no inducidos (como se describe en el pie de la figura 5), conteniendo el gen quimérico. La detección se realizó mediante la absorción de proteína A de *Staphylococcus aureus* marcada con ¹²⁵I por los anticuerpos de conejo antitoxina.

Para comprobar que el péptido truncado producido por estos clones tenía actividad biológica se realizó una confrontación con larvas de *Heliothis virescens*. En la figura 7 puede observarse que el sistema biológico utilizado fue sensible a aproximadamente 10 ng de tóxina por cm² de hoja, obteniéndose el 100% de muertes al ingerir las larvas esta dosis. Uno de los clones inducidos produjo estados patológicos y muertes en un número significativo de larvas, con lo cual se puede asegurar que el péptido producido por el gen diseñado mantiene su actividad biológica.

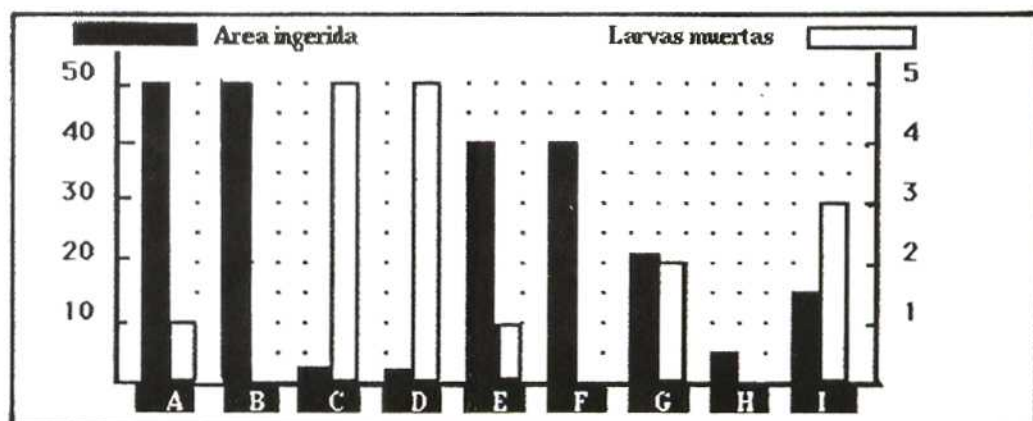


FIG. 7. Actividad biológica de los clones de *E. coli* conteniendo los genes quiméricos de la toxina del Bt. Las determinaciones se hicieron con cinco larvas de *Heliothis virescens* y la evaluación final fue a los cinco días. A) Control; B) pCQV2/MC1066 (1 OD/cm²); C) Toxina de Bt. b. (100 ng/cm²); D) Toxina de Bt. k. (100 ng/cm²); E) pBPCV3/MC1066 (1 OD/cm²) no inducido; F) pBPCV3/MC1066 (1 OD/cm²) inducido; G) pBPCV4/MC1066 (1 OD/cm²) no inducido; H) pBPCV4/MC1066 (1 OD/cm²) inducido; I) pBPK11/MC1066 (1 OD/cm²).

La comparación de la secuencia del fragmento del gen clonado y expresado por nosotros, con la reportada para el Bt. var berliner (Höfte *et al.*, 1986), muestra una gran diferencia en la región 3' del gen truncado, o sea, alrededor de la base 2100 a partir del ATG de la secuencia reportada, manteniendo una alta homología en la región inicial (de la base 1 a la 400 a partir del ATG).

Una señal de parada anterior a la posición esperada (la introducida con el oligo del P.C.R.) de este gen pudiera también ser una explicación alternativa del tamaño menor al esperado encontrado en el producto de la expresión de los clones pBPCV3 y pBPCV4 en la electroforesis de proteínas totales.

CONCLUSIONES

Hemos logrado rescatar de una preparación de ADN total del Bt. var. berliner, mediante P.C.R., una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que es reconocida por los anticuerpos antitoxina del *B. thuringiensis* y tiene una alta homología con el gen reportado en la región 5', pero difiere en la 3'. El péptido producido por el gen quimérico es capaz de producir una sintomatología similar a la toxina original en larvas de *H. virescens*.

REFERENCIAS

- BIRBOIM, H. C. y J. DOLLY (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Ac. Res. 7: 1513-1519.
- DULMAGE, H. T. (1981). *Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis and their potential pest control*. Microbial Control of Pest Diseases, Ed. Burges H. D. (ac. London) pp. 193-222.
- ENGELKE, D.R.; P.A. HOENER y F.S. COLLINS (1986). *Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA*. Proc. Nat. Ac. Sci. USA 85: 544-546.
- FISCHHOFF, D.A.; K. KUSANO-KRETZMER; E.J. MEYER; D.E. ROCHESTER; S.G. ROGERS y R.T. FRALEY (1987). *Insect tolerant transgenic tomato plants*. Bio/Technology 4: 305-308.
- HÖFTE H.; H. DE GREVE; J. SENRICK; S. JANSEN; J. MAHILLON; C. AMPE; J. VANDEKERCKHOVE; H. VANDERBRUGGEN; M. VAN MONTAGU; M. ZABEAN y M. VAECK (1986). *Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of Bacillus thuringiensis berliner 1715*. Eur. J. Biochem 161: 273-280.
- IBARRA, J.E. y B.A. FEDERICI (1986). *Isolation of a relatively Nontoxic 65 - Kd protein inclusion from the parasporal body of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Journal of Bacteriology 165: 527-533.
- KRONSTAD, J.W.; H.E. SCHENPF y H.R. WHITELY (1983). *Diversity of location for Bacillus thuringiensis crystal protein genes*. Journal of Bacteriology 154: 419-428.
- QUEEN, C. (1983). *A vector that uses phage signals for efficient synthesis of proteins in E. coli*. Journal of Molecular and Applied Genetics 2: 1-10.
- SAIKI, R.K.; T. BUGAWAN; G.T. HORN; K. MULLIS y H. ERLICH (1986). *Analysis of enzymatically amplified B- globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature 324: 163-166.
- SANGER, F.; S. NICKLEN y A.R. COULSON (1977). *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*. Proc. Natl. Ac. Sci. USA 74: 5463-5467.
- TOJO A. (1986). *Structure of a subunit protein of bipiramidal-endotoxin produced by Bacillus thuringiensis strain HD-1*. Agric. Biol. Chem. 50: 157-162.
- VAECK, M.; A. REINAERTS; H. HÖFTE; S. JANSEN; M. DE BEUCKELEER; C. DEAN; M. ZABEAU; M. VAN MONTAGU y J. LEEMANS (1987). *Transgenic plants protected against insect attack*. Nature 328: 33-37.
- WABIKO, H.; G.A. HELD y L.A. BULLA Jr. (1985). *Only part of the protein gene of Bacillus thuringiensis subsp. berliner 1715 is necessary for insecticidal activity*. Applied and Environmental Microbiology 49: 706-708.
- YANISCH - PERRON, C.; J. VIEIRA y J. MESSING (1985). *Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC 19 vectors*. Gene 33: 103-119.