

Expresión heteróloga del gen que codifica para la delta-endotoxina activa de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* en *E. coli*

G. DE LA RIVA,¹ B. XOCONOSTLE-CÁZARES,² C. GUTIÉRREZ,¹ R. MORÁN,¹ A. ALVAREZ,² L. HERRERA-ESTRELLA² y S. PÉREZ¹

¹ Agrupación de Plantas y Fertilizantes, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato, Apartado 629, Irapuato, Gto., México

Recibido en junio de 1991

Aprobado en septiembre de 1991

RESUMEN

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de ADN que codifica para la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* a partir de su ADN total. El gen amplificado presenta modificaciones por la introducción en sus extremos de sitios de restricción que facilitan su manipulación. El gen fue insertado en pUC19 y expresado en *E. coli*. La proteína producida se analizó por métodos inmunológicos, presentando actividad insecticida contra larvas de *Leptinotarsa texana*.

SUMMARY

Using Polymerase Chain Reaction (PCR), we have amplified a DNA fragment encoding an insecticidal toxin from the coleopteran specific *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* from its total DNA. The gene was altered for cloning and expression purposes, including the new restriction sites. The gene was cloned into pUC19 and expressed in *E. coli*. The protein produced was analyzed by immunological methods and its insecticidal activity against larvae of *Leptinotarsa texana* was evaluated.

INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis var. *tenebrionis* (Btt) es una bacteria Gram positiva, que se caracteriza por producir durante la esporulación una inclusión proteica que ha mostrado elevada toxicidad contra larvas de coleópteros (Krieg *et al.*, 1983) tales como *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa), *Hypera brunneipennis* (gorgojo de la alfalfa), *Anthonomus grandis* (picudo del algodón); todas ellas plagas de interés económico (Herrnstadt *et al.*, 1987). Hasta la fecha se han publicado la clonación y la caracterización de los genes que codifican para la toxina de Btt (Herrnstadt *et al.*, 1987; Sekar *et al.*, 1987; Jahn *et al.*, 1987; McPherson *et al.*, 1988; Donovan *et al.*, 1988).

El gen que codifica para la delta-endotoxina es capaz de sintetizar proteínas de 72 y 67 kDa, tanto en Btt o como cuando es clonado y expresado en *E. coli*. Esto se atribuye a la existencia de dos codones de

iniciación en el ARN mensajero (Seong-Lyul Rhim *et al.*, 1990), aunque no se descarta un procesamiento proteolítico a partir de la proteína de 72 kDa (Sekar *et al.*, 1987). Ambas proteínas poseen idéntica actividad biológica contra larvas de coleópteros. Por otra parte, no es alterada la capacidad entomocida de una proteína de fusión cuyo peso molecular es de 85 kDa, obtenida al fusionar hacia el extremo 5' del gen estructural una secuencia que codifica para un segmento de la polimerasa del bacteriófago MS2 (Seong-Lyul Rhim *et al.*, 1990).

En el presente trabajo se usó la técnica de PCR para sintetizar *in vitro* un fragmento de ADN que codifica para la toxina de Btt. Las aplicaciones de esta técnica son muy diversas en biología molecular: se ha empleado en la clonación de secuencias genómicas (Scharf *et al.*, 1986; De la Riva *et al.*, 1989); en secuenciación directa de ADN genómico y mitocondrial (Jeffreys *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 1987); en análisis de variaciones de secuencias nucleotídicas (Bos *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988); para diagnóstico de enfermedades (Bugawan *et al.*, 1988, Dilella *et al.*, 1988) y en análisis de células y organismos transgénicos (Castro *et al.*, 1989; Goyenechea *et al.*, 1991).

El gen aislado presenta algunas alteraciones introducidas durante la amplificación, como son la presencia de los sitios de restricción HindIII y BglII en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente. El gen de la toxina se insertó en el vector pUC19 y se expresó en *E. coli*. La proteína fue analizada por métodos inmunológicos, presentando actividad entomocida contra larvas de *Leptinotarsa texana*, estimándose la dosis letal media para esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivo

La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* cryIIIA (cryC) serotipo H8a8b, se utilizó para la purificación de la toxina y la obtención del ADN total. Como hospedero de los plasmidios recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* BB4 (Bullock *et al.*, 1987). El gen de la toxina de Btt se clonó en pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), dando origen al plasmidio recombinante pBtt3. Para expresar el gen en *E. coli*, este fue subclonado en pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), el plasmidio recombinante se denominó pBtt110.

Para la obtención de la toxina se creció la bacteria en medio de cultivo que favorece la esporulación, constituido por hidrolizado de caseína (10 g/l), extracto de levadura (2 g/l), MgSO₄·7H₂O (300 mg/l), ZnSO₄·7H₂O (2 mg/l), MnSO₄ (20 mg/l) y FeSO₄·7H₂O (20 mg/l). Para la obtención de ADN total, la bacteria se creció en medio Luria Broth (LB), utilizado también en *E. coli*, compuesto por triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l) y NaCl (10 g/l) y agar cuando se requirió medio sólido (15 g/l). Cuando fue necesario, el medio LB fue suplementado con ampicilina (100 mg/l). El procedimiento de clonación y manipulación del ADN se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Enzimas de restricción y modificación

Todas las enzimas de restricción y modificación fueron suministradas por la firma ENZIBIOT (La Habana, Cuba), utilizándolas de acuerdo con sus recomendaciones.

Purificación de la toxina y generación de anticuerpos específicos

Para la purificación de la toxina se empleó el método descrito por Gutiérrez (1990). Se inició el crecimiento de Btt en medio líquido a 28°C con agitación vigorosa, se verificó el estado de esporulación del cultivo, que ocurrió al séptimo día, mediante microscopía óptica. Se cosechó el complejo spora-cristal mediante centrifugación a 9 600 rpm en rotor RPR12 Hitachi, 10 min, 4°C. El precipitado se lavó cuatro veces con agua destilada estéril fría, enriqueciéndose en cada lavado la fracción del cristal paraesporal. El precipitado final, constituido esencialmente por cristales, se resuspendió en 3 ml de agua destilada estéril. La determinación del peso

molecular y grado de pureza de la toxina se estimó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%.

Los anticuerpos específicos se purificaron a partir del suero de un conejo que fue inmunizado con toxina purificada, logrando obtenerse IgG altamente específica. En este proceso se utilizó el método descrito por Harlow *et al.* (1988). La pureza y especificidad de los anticuerpos purificados se comprobó mediante el procedimiento descrito por Daneels *et al.* (1986).

Clonación del gen de la delta-endotoxina de Btt mediante PCR

El ADN total de Btt se obtuvo según el método descrito por Xoconostle-Cázares (1989). Las células se cosecharon a partir de 200 ml de cultivo en medio LB, crecido a 28°C hasta $D.O._{(600\text{ nm})} = 0,6$.

Tomando como base la secuencia reportada por Sekar *et al.* (1987), se sintetizaron oligonucleótidos para llevar a cabo la amplificación génica por PCR. Estos oligonucleótidos introducen los sitios de restricción HindIII y BglII en los extremos 5' y 3' respectivamente, para facilitar la manipulación del gen.

La amplificación se realizó en un bloque térmico programable Hybaid (Inglaterra) en treinta ciclos. Cada ciclo consistió en 1 min a 95°C para la desnaturalización del ADN, 1 min a 55°C para la unión de los oligonucleótidos y 3 min a 72°C para la extensión de la cadena llevada a cabo por la enzima Taq polimerasa I (ENZIBIOT, Cuba). Las condiciones de la reacción se establecieron de acuerdo con la metodología descrita por Saiki *et al.* (1988), pero usando la solución tampón recomendada por Frohman *et al.* (1988, 1990). En el último ciclo el tiempo de extensión fue de 5 min, con el objeto de favorecer una mejor terminación de la reacción de polimerización.

Ensayo de actividad biológica

La cepa *E. coli* BB4 fue transformada con el plasmidio pBtt110 y se creció en medio líquido LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml e IPTG 0,5% hasta alcanzar $D.O._{(600\text{ nm})} = 0,5$. Las células se lavaron con agua destilada estéril tres veces y se resuspendieron en una solución de 0,5 M Tris-HCl pH 8 y fueron sonicadas por 45 s, 70 W, dos veces. El lisado fue lavado con la solución de 0,5 M Tris-HCl pH 8 cinco veces y se extrajeron los carbohidratos con lavados de acetona a -20°C. El aislado proteico fue separado en función de su peso molecular

por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se determinó la relación molar de la toxina contenida mediante un análisis de densitometría.

Para el análisis de actividad biológica, se utilizó como insecto susceptible a *Leptinotarsa texana*, especie que muestra idéntica susceptibilidad que *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa), pero que no constituye una plaga para la agricultura. La colonia de *L. texana* fue mantenida en condiciones de laboratorio con dieta natural, que consiste en hojas verdes de *Solanum eleagnifolium* (trompillo), solanácea silvestre que constituye el alimento común de esta especie. Se tomaron diluciones seriadas de la proteína tóxica, se mezclaron con un surfactante y se distribuyeron en la superficie de las hojas de trompillo. Las larvas del primer instar se colocaron sobre las hojas y al cabo de cinco días se estimó la mortalidad de las larvas en cada dilución.

RESULTADOS Y DISCUSION

Utilizando la técnica de PCR fue amplificado un fragmento de ADN de 2 kb que corresponde al gen que codifica para la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* a partir de ADN total. Este fragmento se clonó en el sitio SmaI del pUC18, generándose así el plasmidio pBtt3. El pesquisaje de los clones se realizó por hibridación de colonias utilizando como sonda un oligonucleótido cuya secuencia corresponde a una región interna del gen. Esta construcción contiene el gen completo cuya secuencia de aminoácidos predicha a partir de su secuencia nucleotídica corresponde a la proteína de 72 kDa.

La introducción de los sitios HindIII y BglII en la región 5' y 3' respectivamente, facilita no sólo la manipulación del gen para propósitos de clonación y expresión, sino también lo hace más versátil para futuros trabajos destinados a controlar su expresión en bacteria y eventualmente en plantas (figura 1).

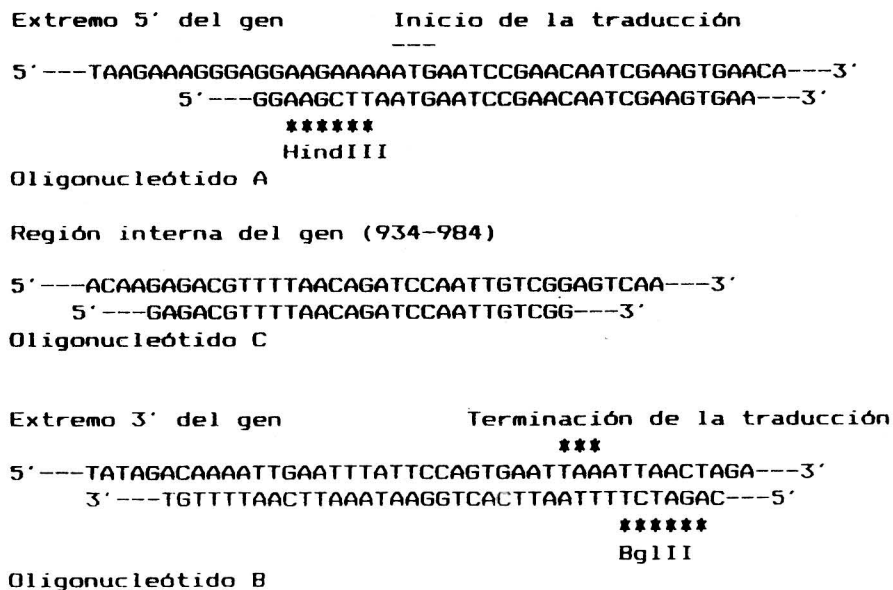


FIG. 1. Oligonucleótidos utilizados en el PCR y clonación del gen de la delta-endotoxina del Btt y comparación con la secuencia original del gen. Los oligonucleótidos A y B introducen los sitios de restricción HindIII y BglII respectivamente. El oligonucleótido C fue usado como sonda en el pesquisaje de los clones. La posición de las bases se asumió a partir del inicio de la traducción.

El plasmidio pBtt3 fue digerido con las enzimas de restricción HíndIII y BglII. El segmento de 2 kb obtenido se insertó en los sitios HindIII y BamHI del pUC19, de tal forma que el gen se colocó en fase con el marco de lectura abierto del gen que codifica para el péptido alfa de la β -galactosidasa. Las bacterias fueron seleccionadas por inmunoidentificación de colonias y un análisis de proteínas totales, permite apreciar la proteína sintetizada. Esta construcción, denominada pBtt110, produce en la cepa hospedera *E. coli* BB4 una fuerte expresión del gen cuando es inducida con IPTG, obteniéndose una proteína de peso molecular estimado de 72 kDa y otra de 67 kDa (figura 2). Esto se observó también en los extractos proteicos de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.

La presencia de ambas proteínas se explica por la existencia de un segundo inicio de traducción que se localiza en el codón de metionina situado en el aminoácido 48 de la secuencia deducida (Seong-Lyul Rhim *et al.*, 1990), aunque es posible que se deba también al procesamiento proteolítico de la proteína de 72 kDa. En preparaciones de la toxina natural del Btt se observa durante su almacenamiento, un incremento de la fracción correspondiente a la proteína de 67 kDa mientras que la fracción de 72 kDa decrece proporcionalmente, lo que nos hace suponer la presencia de proteasas procedentes de la bacteria de origen. La liberación de tales proteasas durante la extracción y purificación de la toxina ha sido comprobada por Bernhard *et al.*, pero

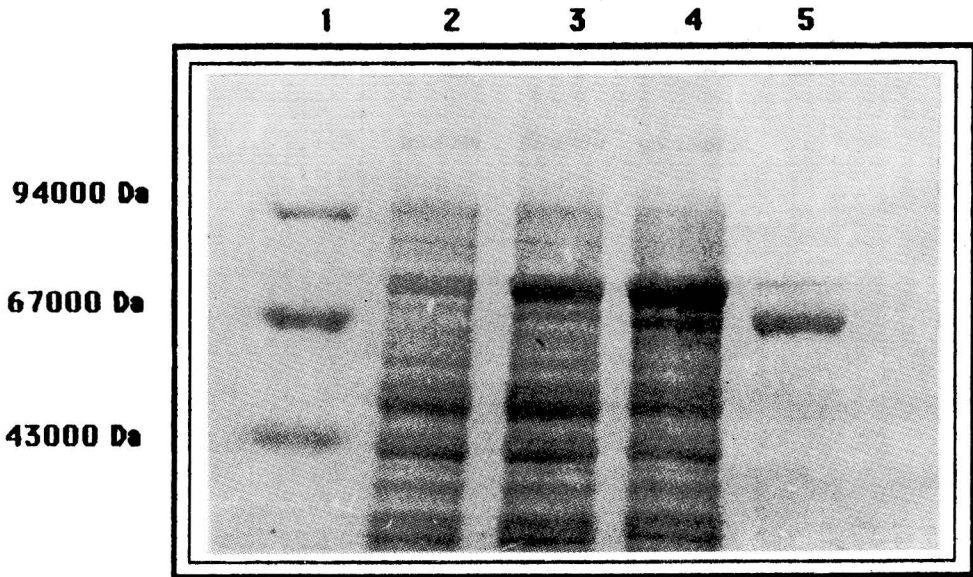


fig. 2A

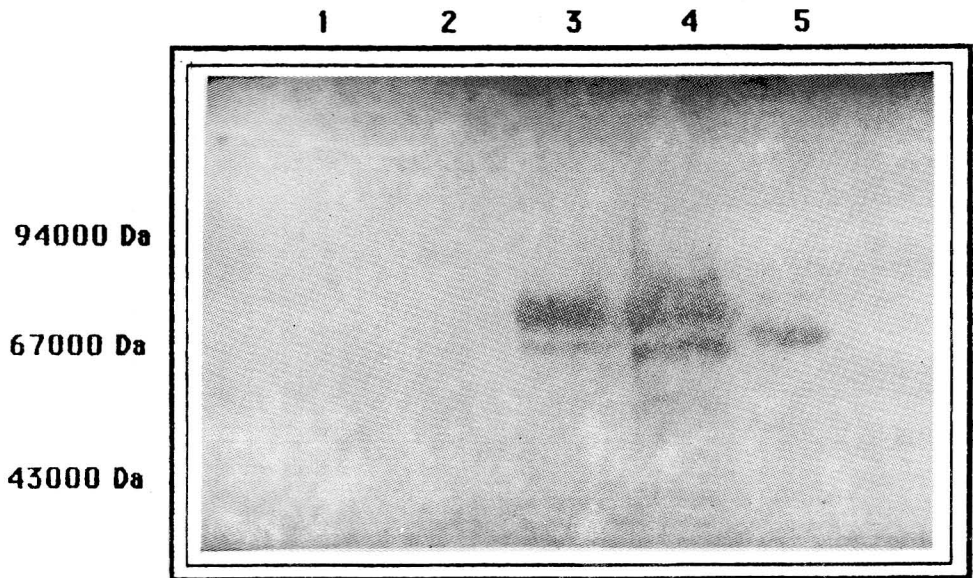


fig. 2B

FIG. 2. Análisis tipo *Western blot* de la expresión del gen de la delta-endotoxina de Btt en *E. coli*. Los extractos proteicos se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE, 12%) observándose la producción de dos proteínas de peso molecular predicho de 72 y 67 kDa (2a). Se realizó un análisis tipo *Western blot* con anticuerpos anti-toxina de Btt que identificó positivamente a estas proteínas (2b). Las aplicaciones del 1 al 5 corresponden respectivamente a: marcadores de peso molecular, 10 μ g de proteína total del control negativo (*E. coli*-pUC19), 10 μ g de proteína total del clon pBtt110 no inducido, 10 μ g de proteína total del clon pBtt110 inducido con IPTG, control positivo (5 μ g de toxina purificada).

no sabemos si este procesamiento proteolítico ocurre normalmente en el *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Los extractos proteicos recombinantes que dieron señales positivas en un análisis de tipo *Western blot* fueron ensayados por su actividad entomocida contra larvas de *Leptinotarsa texana*. Las larvas del primer instar fueron alimentadas con diluciones seriadas de la proteína tóxica y al término de cinco días se estimó la mortalidad en cada dilución. Se efectuaron tres repeticiones y se calculó la concentración letal media de la toxina para esta especie, la cual asciende a 860 ng por gramo de hoja (tabla 1).

Actualmente trabajamos con el objetivo de colocar este gen bajo el control de promotores adecuados para la expresión en plantas y finalmente obtener plantas transgénicas con actividad larvicida contra coleópteros.

REFERENCIAS

- BERNHARD, K. (1986). Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 261-265.
- BOS, J.L.; E.R. FEARON; S.R. HAMILTON; M. VERLAAM DE VRIES; J.H. VAN BOOM; A.J. VAN DER EB y B. VOGELSTEIN (1987). Prevalance of ras gene mutation in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-295.
- BUGAWAN, T.L.; R.K. SAIKI; C.H. LEVENSON; R.M. WATSON y H.A. ERLICH (1988). The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyse enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Biotechnology* 6: 943-947.
- BULLOCK, W.O.; J.M. FERNANDEZ y J.M. SHORT (1987). XL-Blue, high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase section. *Biotechniques* 5: 376-379.
- CASTRO, F.O.; A. PÉREZ; A. AGUILAR; G. DE LA RIVA; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1989). Expresión del gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en ratones transgénicos. *Interferón y Biotecnología* 6: 251-257.

Tabla 1
ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE LA TOXINA DE BTT RECOMBINANTE CONTRA LARVAS DE LEPTINOTARSA TEXANA

Toxina recombinante (ng/g de hoja)	Mortalidad (%)	Toxina natural (ng/g de hoja)	Mortalidad (%)
2 000	100	2 000	100
1 800	90	1 800	89
1 250	60	1 250	62
860	51	860	53
520	39	520	40
40	3	40	5
0	0	0	0

Ensayo de la actividad larvicida de la toxina de Btt recombinante contra larvas de *Leptinotarsa texana*. Se usaron 20 larvas del primer instar para cada una de las diluciones de la toxina recombinante analizadas, comparándose su actividad larvicida con la actividad de igual cantidad de toxina obtenida de su fuente natural. Los datos que aparecen en la tabla representan los valores medios de tres repeticiones del experimento.

- DE LA RIVA, G.; P. ORAMAS; B. GOYENECHEA y S. PEREZ (1989). Clonaje y expresión de un gen quimérico que codifica para la toxina de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* por PCR. *Interferón y Biotecnología* 6: 234-239.
- DANEELS, G., M. MOEREMANS, M. DE RAEYMAEKER y J. DE MEY (1986). Introduction of a selectable gene into murine T-lymphoblasts by a retroviral vector. *J. Immunol. Meth.* 89: 89-91.
- DILELLA, A.G.; W.M. HUANG y S.L.C. (1988). Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polimerase chain reaccion. *Lancet* 6: 497-499.
- DONOVAN, W.P.; J.M. GONZALEZ Jr.; P. GILBERT y C. DANKOESIK (1988). Isolation and characterization of EG 2158 a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae and nucleotide sequence of the toxic gene. *Mol. Gen. Genet.* 214: 365-372.
- FROHMAN, M.A.; M.K. DUSH y G.R. MARTIN (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification use a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8998-9002.
- FROHMAN, M.A. (1990). *PCR Protocol: A Guide to Methods and Aplications*. Acad. Press. Inc. (Ed.). Chap. RACE, U.S.A..
- GOYENECHEA, B.; R. MORAN; C. GUTIERREZ; G. DE LA RIVA y S. PEREZ (1991). Pesquisaje de plantas transgénicas por P.C.R.. *Biotecnología Aplicada* 8: 237-241.
- GUTIERREZ, C. (1990). *Sistema de verificación en proyecto de plantas transgénicas autopesticidas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Agrupación de Plantas y Fertilizantes del CIGB, La Habana, Cuba.
- HARLOW, E. y O. LANE (ed.) (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
- HERRNSTADT, C.; T.E. GILROY; D.A. SOBIESKI; B.D. BENNETT y F.H. GAERTNER (1987). Nucleotide sequence and deduced aminoacid sequence of a coleopteran active delta-endotoxine gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene* 57: 37-46.
- JAHN, N.; W. SCHNETTER y K. GEIDER (1987). Cloning of an insecticidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and its expression in *E. coli* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 311-315.
- JEFFREYS, A.J.; V. WILSON; R. NEWMANN y J. KEYTE (1988). Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: toward DNA fingerprinting of single cells. *Nucl. Aci. Res.* 16: 311-315.
- KRIEG, A.; A.M. HUGER; G.A. LANGENBRUCH y W. SCHNETTER (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer. *Z. Angew. Entomol.* 96: 500-508.
- MC. PHERSON, S.A.; E.J. PERLAK; R.L. FUCHS; P.G. MARRONE; P.B. LAVRIK y D.A. FISCHHOFF (1988). Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biotechnology* 6: 61-66.
- SAIKI R.K. y H.A. ERLICH (1988). K.E. Davies (Ed.). *Genome Analysis, A Practical Approach*. Oxford, U.K.
- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH y T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. (Sec. Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.), U.S.A..
- SCHARF, S.J.; G.T. HORN y H.A. ERLICH (1986). Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence. *Science* 233: 4768-4775.
- SEKAR, V.; V.D. 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* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 7036-7040.
- SEONG-LYUL RHIM; N. JAHN; W. SCHNETTER y K. GEIDER (1990). Heterologous expression of a mutated toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *FEMS Microbil. Lett.* 66: 95-100.
- WONG, C.; C.E. DOWLING; R.K. SAIKI; R.G. HIGUCHI; H.A. ERLICH y H.H. KAZAZIAN (1987). Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330: 384-388.
- XOCONOSTLE-CAZARES, B. (1989). *Clonación, caracterización y expresión del gen que codifica para la delta-endotoxina de Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- YANISCH-PERRON, C.; J. VIEIRA y J. MESSING (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13MP18 and pUC19. *Gene* 33: 103-119.