



GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Bacillus thuringiensis* QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA Cry3A Y LA ENDOQUITINASA ChiA74Δsp

Celia Monserrat Luna-Castro, Arely Acevedo-Escamilla, Luz Edith Casados-Vázquez, J. Eleazar Barboza-Corona*.
División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. México. Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, C.P. 36500. Irapuato, Gto. monlu_46@hotmail.com, josebar@ugto.mx*

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, coleópteros, quitinasas.

Introducción. Se ha demostrado que las quitinasas de *B. thuringiensis* tiene la capacidad de destruir la membrana peritrófica, una estructura similar a una película constituida por un complejo de quitina-proteína que protege y separa los alimentos a partir del tejido en el intestino medio de los insectos, lo que provoca un aumento de la actividad insecticida de las proteínas Cry.^(1,2) Nuestro objetivo general está enfocado a estudiar el efecto potenciador de la quitinasa ChiA74Δsp sobre la proteína Cry3A de *B. thuringiensis*. En este trabajo se generaron cepas recombinantes de *B. thuringiensis* que expresan la proteína Cry y la endoquitinasa en forma de cuerpos de inclusión

Metodología. Se realizaron tres construcciones, las cuales fueron introducidas en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* 4Q7. La primera contiene el gen *chiA74* bajo el control del promotor silvestre seguido de *cry3A* bajo el control del sistema pcyt/STAB (4Q7/pEHchiA74Δsp-cry3A-pcyt/STAB). La segunda tiene el gen *chiA74* bajo el control del sistema pcyt/STAB y el gen *cry3A* con su promotor nativo (4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A*). La tercera contienen gen *chiA74* y el gen *cry3A*, ambos bajo el control del sistema pcyt/STAB (4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A*-pcyt/STAB). Los cuerpos de inclusión de las quitinasas generados por las cepas recombinantes se solubilizaron y se determinó su actividad mediante fluorescencia utilizando un compuesto sintético derivado de quitina. La estabilidad de las proteínas se determinó con el peso molecular de las quitinasas y la proteína Cry3A mediante geles de poliacrilamida y zimogramas (quitinasas) usando 4-MU-(GlcNAc)₃ para detectar la actividad de endoquitinasa.

Resultados. Se comprobó mediante geles SDS-PAGE que la proteína expresada en las construcciones concuerda con el peso molecular de la proteína Cry3A (Fig.1). Se pudo observar la actividad de quitinasa en las construcciones mediante zimogramas (Fig.2)

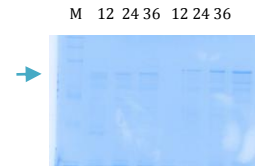


Fig.1. SDS-PAGE de las construcciones 4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A*-pcyt/STAB y 4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A*.

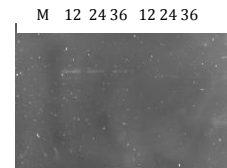


Fig.2 Zimograma de las construcciones 4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A*-pcyt/STAB y 4Q7/pEBchiA74Δsp- *cry3A* que detecta la actividad de la endoquitinasa *chiA74* usando el sustrato sintético 4-MU-(GlcNAc)₃.

Cepa	mU/mg
4Q7/pEBchiA74Δsp- <i>cry3A</i> -pcyt/STAB	5.843484631
4Q7/pEBchiA74Δsp- <i>cry3A</i>	719.0454779

Tabla 1. Resultados en unidades de fluorescencia

Conclusiones. El tener ambos genes *ChiA74Δsp* y *Cry3A* regulados bajo el mismo promotor pcyt/STAB disminuye la actividad de la quitinasa con respecto a la construcción donde el gen *Cry3A* está regulado bajo su promotor silvestre y la quitinasa bajo el promotor pcyt/STAB.

Agradecimiento. El presente trabajo cuenta con apoyo financiero SEP-CONACYT Proyecto 156682. Celia Monserrat Luna Castro es estudiante de la maestría en Biociencias y recibe beca de CONACYT.

Bibliografía. (1) Park HW, Ge B, Bauer LS, Federici BA (1998) Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. Appl Environ Microbiol 64:3932–3938. (2) Barboza-Corona J. E, Ortiz-Rodríguez T, de la Fuente-Salcido N, Ibarra J, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R (2009). Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. Antonie van Leeuwenhoek. 96: 31-42.