

CONSTRUCCION DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Bacillus thuringiensis* VAR *israelensis* PARA LA EXPRESION DEL GEN *Cry11A*

Octavio Blanco Amador*, Gerardo Valadez Sánchez** y Mario Ramírez-Lepe*

*Instituto Tecnológico de Veracruz. A.P. 1380 Veracruz, Ver. E mail: lepe@itver.edu.mx

**Lab. de Biología Molecular. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV. México D.F.

Palabras clave: *cry11A*, *Bacillus thuringiensis*,

Introducción.

La toxicidad que presenta la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*) sobre dipteros está determinada por un plasmido de 137 kb. llamado pBtoxis¹. En este plasmido de 75 Mda. se encuentran los genes *cry4A*, *cry4B*, *cry4C*, *cry11A* y *cytA* que codifican para 5 polipéptidos de 134, 128, 78, 72 y 27 kDa respectivamente, siendo expresados durante la esporulación². El gen *cry11A* es responsable de codificar para la proteína cry11A que es uno de los componentes principales del complejo proteico con actividad larvicida. La determinación de la secuencia del DNA indica que el gen *cry11A* es el segundo gen de un operón el cual incluye tres genes. Estos genes *p20*, *cry11A* y *p19* están organizados en una unidad transcripcional³.

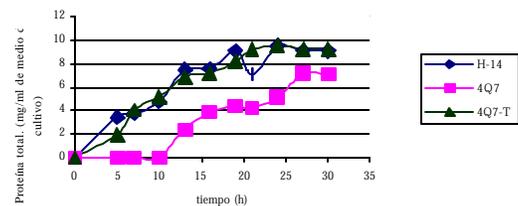
En el presente trabajo se construyó una cepa de *Bacillus thuringiensis* que contiene un plasmido con el gen *cry11A* y los elementos necesarios con la finalidad de estudiar su expresión.

Metodología

La amplificación del gen *cry11A* se realizó por PCR a partir del DNA de la cepa silvestre de *B.t.i.* Los oligonucleótidos 5'CTCTATTACCTTCTCAGGCATTCAATC 3' y el reverso 5'ATGGATCCTAAAATTACAAGAGGAGCC 3' se utilizaron para amplificar 3202 pb. que contienen 1903 pb. del gen *cry11A* y los genes *p19* y *p20* (GeneBank M31737). Se utilizó el vector pHT315 (Instituto Pasteur, Paris, Francia) que contiene los orígenes de replicación de *E.coli* y de *B.t.* y resistencias para Amp, y Eritromicina. Se obtuvo un vector topo a partir del vector pHT315 y este se utilizó para realizar la ligación del producto de PCR utilizando para ello T4DNA ligasa. El plasmido obtenido se utilizó para transformar por electroporación a la cepa curada de plasmidos de *B.t.* 4Q7.

Resultados y Discusión.

La cepa 4Q7-cry11A se hizo crecer en medio de cultivo LB y se expresó el polipéptido de 72 kDa. como se observa en la figura. En la cinética de crecimiento se tiene una producción de proteína similar a la cepa silvestre. Al evaluar la actividad biológica del producto de la fermentación contra larvas del 3er. estadio de *Aedes aegypti* se obtuvo un valor de LC₅₀ de 3.19 ppm para 4Q7-cry11A, mientras que para la cepa silvestre (H-14) tuvo un valor de 0.087 ppm. La cepa 4Q7 no tuvo actividad larvicida. Estos resultados obtenidos son similares a los reportados en la literatura. Esta cepa nos permitirá estudiar la regulación del gen *cry11A* en estudios posteriores



Cinética de producción de proteína total producida por las cepas de *B.t.i*

Conclusiones

El microorganismo construido expresó una proteína de aproximadamente 72 kDa que corresponde al valor esperado. y su actividad biológica es similar a la reportada en la literatura para la proteína purificada del complejo proteico.

Agradecimiento.

Este trabajo fué financiado por CoSNET. Agradecemos también el apoyo de la beca de CoNACYT a O. Blanco A..

Bibliografía

- 1.- Ben-Dov, E., Boussiba, S. and Zaritsky, A. 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. **177**: 2851-2857
- 2.- Federici, B.A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. Arch. Ins. Biochem. Physiol. **22**:357-371.
- 3.- Adams, L.F., Visick, J.E. and Whiteley, H.R. 1989. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**: 521-530

