

# EXPRESIÓN DEL GEN *cry11A* DE *Bacillus thuringiensis* VAR *israelensis* EN *Saccharomyces cerevisiae* BJ2407

Rodolfo Quintana-Castro\*, Fernando Moreno-Sanz\*\* y Mario Ramírez-Lepe\*

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

\*\*Universidad de Oviedo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Oviedo España

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

## Introducción.

La construcción de cepas de microorganismos recombinantes para la obtención de proteínas heterólogas es una de las alternativas más viables para obtener mejores niveles de producción y mejorar los sistemas de recuperación. Una ventaja añadida de estos microorganismos es que permite estudiar mecanismos de regulación para la expresión de estos genes. Para la construcción de estos microorganismos se toman en cuenta diversos puntos como son el tipo de célula que se utilizara como hospedera y el vector de clonación que se utilizará. Han sido diferentes los microorganismos que se han utilizado para expresar los genes que codifican los diversos cristales de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*B.t.i.*), pero los trabajos que tratan sobre la expresión de de estos genes en *Saccharomyces cerevisiae* son escasos<sup>1</sup>. Desde el punto de vista científico las levaduras ofrecen ventajas entre las cuales podemos considerar modificaciones postraduccionales y que se han utilizado para expresar gran variedad de proteínas como enzimas u hormonas.

## Metodología

### Obtención del gen *cry11A*

El plasmido de 137 kb que posee el gen *cry11A*, el cual codifica a la proteína de 72 kDa, fue obtenido por una lisis alcalina de cultivos de *Bacillus thuringiensis* crecidas en medio Luria bertani (LB), la secuencia del gen *cry11A* fue obtenida del NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)<sup>2</sup> y los oligonucleótidos iniciales para la amplificación del gen fueron sintetizados por la compañía IECSA. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador Biorad obteniendo fragmentos de aproximadamente 2 kb, que posteriormente fueron purificados con el kit GeneClean Bio-101. El vector YEpHXK1/GST fué construido con el promotor del gen *HXK1* de *S. cerevisiae*, fusionado en pauta de lectura con el gen de la glutathion transferasa y un sitio de clonación múltiple. Es un vector episomal utilizado para la transformación de la levaduras/*E.coli*, posee los marcadores URA3 y Amp<sup>R</sup>, además de que genera una proteína de fusión que en este caso fue GST-Cry11A.

### Ligación y transformación

La relación de gen y vector para llevar a cabo la ligación fue de 3:1 respectivamente. El técnica para la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* BJ2407 fue con acetato de litio y para posteriormente crecer estas células en medio deficientes en uracilo, ya que esta cepa de *Saccharomyces* es mutante

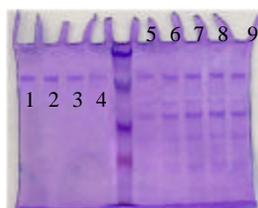
del gen *Ura*, permitiendo que solo crezcan células transformadas.

## Resultados y Discusión

### Expresión del gen *cry11A*

La expresión del gen *cry11A* produjo una proteína la cual fue recuperada en con una columna de purificación con afinidad a la GST para posteriormente ser eluida y corrida en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

5,6,7,8 y 9 son muestras antes de pasarlas por la columna, 1,2,3 y 4 son muestras después de pasar por la columna



### Prueba de Actividad Biológica.

Esta se realizó utilizando el producto de la fermentación de la cepa recombinante utilizando medios de cultivo con

glucosa, etanol, glicerol manosa y galactosa. Se hizo un análisis de la expresión realizando bioensayos sobre larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*.

## Conclusiones

	<i>S. cerevisiae</i> transformada	<i>S. cerevisiae</i> sin transformar
Concentración	2 ppm	2 ppm
Tiempo (H)	48	48
Numero de Larvas	20	20
Mortalidad	35%	0%

El microorganismo construido crecido en etanol expresó una proteína de aproximadamente 98 kDa que corresponde al peso de la proteína de fusión.

## Agradecimiento.

Este trabajo fué financiado por CoSNET. Agradecemos también el apoyo de la beca de CoNACT a R. Quintana.

## Bibliografía

- 1.- Kayo Watanabe, 1995 Expression of 135-kDa insecticidal Protein gene from *Bacillus thuringiensis* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. 18: pp 1483-1485
- 2.- William P. Donovan 1988, Molecular characterization of a gene encoding a 72-kDa mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. of Bacteriol. 45: pp 4732-4738