

# ESTRATEGIAS MOLECULARES PARA EL AISLAMIENTO DE MUTANTES EN *Bacillus thuringiensis* QUE AFECTEN LA REGULACION DE *cryIAc*.

\*Pável Sierra M.,\*\*Gabriel Guarneros P., \*Mayra de la Torre M., \*\*\*Gabriela Olmedo A.  
\*Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, \*\*Depto. de Genética y Biología Molecular, \*\*\*Depto. de  
Ingeniería Genética de Plantas CINVESTAV-IPN.  
Fax. (5) 747 70 00 ext. 4305, [psierra@mail.cinvestav.mx](mailto:psierra@mail.cinvestav.mx)

Palabras clave: Regulación, Transposón, *B. thuringiensis*.

## INTRODUCCION

La mutagénesis mediante transposición provee de una poderosa herramienta para el análisis genético de organismos de interés al generar mutantes por la interrupción de alguna secuencia genética. Algunos transposones se han empleado para la mutagénesis en Gram positivas y se ha observado que los sitios blanco donde ocurren las inserciones son aleatorios, además de que con este sistema, es posible el análisis de la secuencia interrumpida gracias a la clonación del transposón<sup>1</sup>. Para *Bacillus thuringiensis* (B.t.), sin embargo, no existe ningún reporte acerca de su utilización. Por otro lado, la mutagénesis química permite seleccionar mutaciones que no pueden obtenerse por transposición, ya sea por que sean polares, afecten algún gen esencial, o no permitan generar cambios sutiles en una proteína de interés.

Así mismo, a fin de visualizar las células mutadas en forma rápida es común el uso de genes reporteros. *lacZ*, el cual utilizado en fusiones transcripcionales permite el estudio de secuencias reguladoras con la ventaja de apreciar los cambios que afecten la regulación del promotor al observar una variación en el fenotipo sobre X-Gal<sup>2</sup>.

En este trabajo se describen algunas de las estrategias probadas en B.t para estudiar la regulación de los genes *cry* dependientes de la esporulación, utilizando un plásmido que permitió monitorear la expresión de *cryIAc*.

## METODOLOGIA

El plásmido pHT1KAc es un "shuttle vector" derivado de pHT304-18Z<sup>2</sup> y fué construido para estudiar la regulación del gen *cryIAc* mediante la expresión de *lacZ* gracias a una fusión transcripcional con una secuencia promotora de 1 kb de *cryIAc*. Este vector fué introducido en B.t HD73 mediante electroporación. La cepa obtenida y denominada HD73 (pHT1KAc), fué transformada nuevamente con el plásmido pIC333 que alberga al minitrasposon Tn10 que confiere resistencia a espectinomicina, para así obtener la cepa HD73 (pHT1KAc pIC333). El proceso de mutagénesis se desarrolló a 28°C a fin de permitir la transposición aleatoria del miniTn10 en el genoma de B.t y posteriormente se eliminó la forma episomal del mini Tn10 con un pase a 41±1°C durante 15 generaciones, dado que pIC333 tiene un replicón termosensible. El escrutinio de las posibles mutantes se llevó a cabo con la búsqueda de las colonias espectinomicina resistentes con fenotipos X-Gal diferentes al control, en este caso se utilizó como control la cepa HD73 (pHT1KAc).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las células sometidas a mutagénesis y posteriormente tratadas para eliminar la forma episomal del minitrasposon Tn10 fueron crecidas en diferentes medios para su análisis habiéndose obtenido lo siguiente: De un 100% de crecimiento que fué observado en medio Tris G sin antibiótico, únicamente el 13% creció en Tris G con espectinomicina; de esta población el 18% son colonias con fenotipo X-Gal diferente al de la cepa control.

Estos resultados sugieren que existe una alta variabilidad en la expresión de  $\beta$ -Gal pero no necesariamente causada por la regulación de *cryIAc*, lo cual fue confirmado cuando se observó que la mayoría de las colonias analizadas y seleccionadas al azar aún producían el cristal paraesporal. La cepa que contiene exclusivamente al pHT1KAc no exhibe esta variabilidad.

## CONCLUSION

El uso del mini Tn10 resultó en una amplia diversidad de fenotipos de expresión de la fusión del promotor de *cryIAc* a *lacZ* a una frecuencia mucho mayor a la que se esperaría de una mutagénesis. Esto dificultó el detectar alguna mutante real afectada en la regulación de *cryIAc*. Posiblemente la inestabilidad observada es causada por recombinación entre los plásmidos del reportero y del transposón. Actualmente estamos intentando simplificar el sistema de mutagénesis mediante el reemplazo del gen *cryIAc* en el megaplásmido por una fusión a *gusA*. Así mismo se realizó una mutagénesis química con EMS que arrojó algunos resultados interesantes que serán discutidos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Didier Lereclus, por facilitarnos material biológico. Pável Sierra es becario del CONACYT.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Camilli, A. Portnoy, D. Youman, P.(1990). Insertional Mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a Novel Tn917 Derivate That Allows Direct Cloning of DNA Flanking Transposon Insertions. *J. Bact.* 172(7):3738-44.
2. Agaisse, H. Lereclus, D.(1994). Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microb.* 13(1):97-107.