

UTILIZACIÓN DEL VECTOR pHT-01 PARA LA SOBREEXPRESIÓN DEL REGULADOR DE ESTADO DE TRANSICIÓN *AbrB* EN *BACILLUS THURINGIENSIS*

Shirley Elizabeth Martínez Tolibia, Martha Dolores Bibbins Martínez, María del Carmen Cruz López, Miguel Ángel Villalobos López, Rosina Cabrera Ruiz, Víctor Eric López y López*
CIBA del Instituto Politécnico Nacional, Carretera Estatal Sta. Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México. Correo electrónico: vlopezyl@ipn.mx

Palabras clave: *AbrB*, pHT01, *Bacillus thuringiensis*

Introducción. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es el agente de control biológico más efectivo contra diversas plagas de insectos, gracias a su capacidad para producir δ -endotoxinas denominadas proteínas Cry durante la etapa de esporulación. Sin embargo, el potencial de *Bt* para secretar proteínas y liberar enzimas hidrolíticas aumenta el interés de expandir el uso de esta bacteria no sólo como bioinsecticida, sino como una maquinaria para la producción de enzimas u otras proteínas de potencial aplicación (1). Existe información muy escasa acerca de los cambios fisiológicos y metabólicos producidos en *Bt* al incrementar la expresión de ciertas proteínas que actúan como factores de transcripción y que modulan la expresión génica, como los reguladores de estado de transición. *AbrB* se ha destacado por ser el regulador de estado de transición central en *B. subtilis* reorganizando la expresión de más de 100 genes de la fase post-exponencial involucrados en diversas funciones como la formación de biopelículas, producción de antibióticos, motilidad, síntesis de enzimas extracelulares y esporulación (2) El presente trabajo tiene como objetivo generar una construcción que promueva la sobreexpresión de *abrB* en *Bt kurstaki* HD73 utilizando el vector comercial pHT-01 (MoBiTec GmbH) diseñado para *B. subtilis*, el cual utiliza el promotor fuerte σ A-dependiente unido al operón *groE* controlable mediante el sistema del operón *lac*. Con ello se pretende modular la expresión génica a partir de la sobreexpresión de *abrB* y evaluar su efecto a nivel fenotípico, mediante análisis de morfología y motilidad tipo swarming.

Metodología.

Se llevó a cabo la amplificación del ORF del gen *abrB* de *Bt* HD73, después se clonó e insertó en el vector pHT-01, transformando la cepa silvestre por electroporación. La verificación de transformantes fue mediante PCR en colonia y secuenciación. La validación de sobreexpresión se realizó mediante RT-PCR de muestras de fermentación a nivel matraz. La construcción se evaluó mediante ensayos de morfología en medio BHI y motilidad en medio LB y agar nutritivo 0.1X (0.7% agar) bajo condiciones control e inducción (1mM IPTG). Inóculo: 3 μ L de cultivo con crecimiento de 16h (6 x 10⁶ células).

Resultados.

En la Fig. 1a se muestran las etapas seguidas durante la construcción de la cepa denominada BtQpHT*abrB*. La Fig. 1b permite validar la sobreexpresión de *abrB* en experimentos de inducción con IPTG a nivel matraz. El análisis de morfología y motilidad (Fig. 2 y 3), mediante la comparación de BtQpHT*abrB* con la cepa parental (HD73), demuestra bacilos más alargados, esporulación disminuida y retrasada (datos no presentados), así como un mayor desplazamiento de BtQpHT*abrB* en los ensayos de motilidad en medios con diferente contenido de nutrientes.

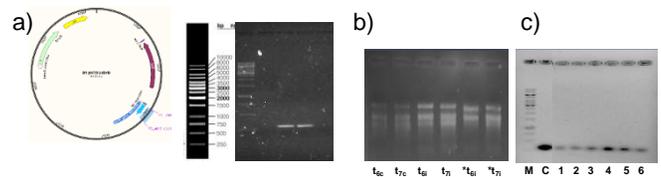


Fig. 1. Etapas de construcción de cepa BtQpHT*abrB*. a) Amplificación de ORF *abrB* y ligación en pHT01, b) muestras de RNA t_{6c} y t_{7c} son controles, t_{6i} , t_{7i} , y $*t_{6i}$, $*t_{7i}$ muestras inducidas a t_1 y t_3 respectivamente y c) RT-PCR a partir de cDNAs M) Marcador de peso molecular, C) gen *abrB* control, 1) t_6 Control, 2) t_7 Control, 3) t_6 Inducción a t_1 4) t_7 Inducción a t_1 , 5) t_6 Inducción a t_3 y 6) t_7 Inducción a t_3 .

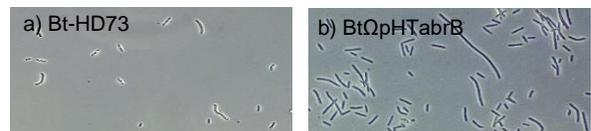


Fig. 2. Análisis de morfología de a) cepa nativa y b) cepa transformada (1mM IPTG) en medio BHI después de 24 h de incubación.

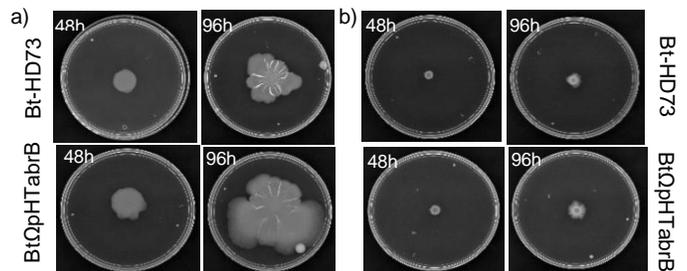


Fig. 3. Ensayos de motilidad swarming en medio a) LB y b) agar nutritivo 0.1X bajo condiciones control y de inducción (1mM IPTG).

Conclusión. El fenotipo observado por efecto de la sobreexpresión de *abrB* es una morfología de bacilo más alargada, esporulación disminuida, así como una velocidad de colonización mayor en ambos medios con la cepa transformada en el ensayo de motilidad swarming. Por lo que el plásmido pHT01 diseñado para *B. subtilis* puede ser utilizado para la transformación de *B. thuringiensis*.

Bibliografía

- Barboza-Corona J.E., de la Fuente-Salcido N.M., León-Galván M.F. (2012) Future Challenges and Prospects of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis Biotechnology*, Sansinea E. Springer, México. pp 367-384.
- Chumsakul O. et al. (2011). *Nucleic Acids Res* 39:414–428.