

# GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Bacillus thuringiensis* QUE EXPRESE UNA VERSIÓN TRUNCADA DE LA ENDOQUITINASA CHIA74

Gutiérrez Araujo Melissa Isabel (1), Barboza Corona José Eleazar (2), González Ponce Karen  
Stephania (2)

1 [Lic. Biotecnología Genómica, Facultad de Ciencias Químico- Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa] |  
[miga\_20@live.com.mx]

2 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la vida, Campus Irapuato- Salamanca, Universidad de Guanajuato] |  
[Josebar@ugto.mx]

## Resumen

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positiva que se utiliza ampliamente como biopesticida y que presenta potencial para su manipulación y mejoramiento. Con el fin de incrementar su eficacia insecticida, se realizó la transformación genética de *B. thuringiensis* Cry-B con las versiones truncadas CAT-FnIII y CAT-DIQ de la endoquitinasa ChiA74 bajo el promotor silvestre pchiA en el vector pHT3101. Se confirmó la presencia del gen por PCR, la síntesis de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, y la actividad enzimática por medio de Zimograma. Se obtuvieron cepas recombinantes de las versiones truncadas CAT/FnIII y CAT+DIQ capaces de expresar sus respectivas proteínas durante su fase de esporulación.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* is a gram-positive bacteria that is widely used as a biopesticide and has potential for its manipulation and improvement. In order to increase its insecticidal efficacy, the genetic transformation of *B. thuringiensis* Cry-B with the CAT-FnIII and CAT-DIQ truncated versions of the ChiA74 endochitinase under the wild-type pchiA promoter in the pHT3101 vector was performed. The presence of the gene was confirmed by PCR, protein synthesis by SDS-PAGE electrophoresis, and enzymatic activity by means of a Zymogram. Recombinant strains of the CAT-FnIII and CAT-DIQ truncated versions capable of expressing their respective proteins were obtained during their sporulation phase.

### Palabras Clave

Cry-B; CAT/FnIII; CAT+DIQ

## INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria entomopatógena gram-positiva que ha sido utilizada como insecticida biológico en todo el mundo durante más de 50 años debido a su capacidad de producir un amplio espectro de proteínas con propiedades insecticidas, entre las que destacan las proteínas Cry [1]. Los insecticidas microbianos *Bt* se consideran altamente amigables con el medio ambiente debido a su especificidad y a su falta de persistencia ambiental [2].

La principal característica de *Bt* es que durante su proceso de esporulación produce cuerpos de inclusión parasporal formados por uno o más cuerpos proteicos cristalinos que son tóxicos principalmente para larvas de insectos [3].

## Proteínas Cry

Las proteínas Cry existen como protoxinas y se convierten en toxinas de insecto activas por proteasas en el ambiente alcalino del tracto gastrointestinal del insecto lepidóptero. Las toxinas activadas se unen a receptores específicos (glicoproteínas de caderina, aminopeptidasa N, etc. [4]) en las membranas de las células epiteliales del tracto gastrointestinal medio del insecto objetivo y forman poros en las membranas permitiendo que el agua y los electrolitos de los jugos del tracto gastrointestinal entren en la célula. Las células epiteliales se hinchan y se lisan, dando lugar a un desequilibrio electrolítico en la hemolinfa del insecto causando parálisis de modo que el insecto deja de comer y muere. Las esporas *Bt* también pueden germinar y colonizar el cuerpo del insecto, permitiendo que las bacterias se reproduzcan [5].

Sin embargo, se han reportado diversas especies de insectos resistentes a las toxinas de *Bt* producidas por plantas modificadas genéticamente [6].

Por ello, uno de los retos actuales de la biotecnología es el mejoramiento de la capacidad insecticida de *Bt* y el diseño de estrategias que permitan retrasar o evitar el desarrollo de insectos resistentes.

Además de las proteínas Cry, *B. thuringiensis* produce quitinasas que son secretadas para hidrolizar la quitina para su uso como fuente de carbono y nitrógeno [7]. La quitina es un polisacárido lineal que consiste en N acetil - glucosamina unida a  $\beta$  - (1 - 4) (GlcNAc), Y forma parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos. La quitina también se encuentra en la pared celular de hongos y levaduras, y las vainas microfilarias de nematodos parásitos [8]. Se ha demostrado que las quitinasas son capaces de incrementar la actividad insecticida de las proteínas Cry y de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, hidrolizando la quitina de la membrana peritrófica del insecto blanco, lo que forma poros que permiten que una mayor cantidad de toxina Cry alcance las células epiteliales del intestino medio del insecto [9-10].

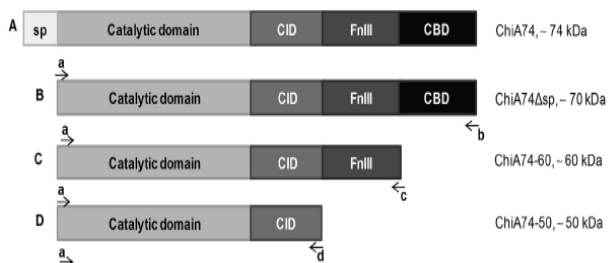
Las quitinasas se clasifican en dos grupos: endo- y exoquitinasas. Las endoquitinasas hidrolizan la quitina en sitios internos obteniendo como producto oligosacáridos de quitina con diferentes grados de polimerización, por otra parte, las exoquitinasas hidrolizan quitina desde el extremo no reductor liberando diacetilquitobiosa y N-acetilglucosamina [7].

## Endoquitinasa chiA74

Endoquitinasa ChiA74 es sintetizada por una cepa de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* que fue aislada en México [11]. ChiA74 tiene un arreglo modular que incluye una péptido señal (sp), un dominio catalítico (CD), dominio de fibronectina tipo III (FnIII) , dominio de unión a quitina (CBD) y un dominio putativo de inserción de quitina (CID) (Figura 1)[12].

En un estudio se produjeron versiones truncadas de chiA74: rChiA74 $\Delta$ sp, rChiA74 $\Delta$ sp-60 (CAT/FnIII) carente de CBD y rChiA74 $\Delta$ sp-50 (CAT+DIQ) carente de CBD-FnIII, las cuales fueron evaluadas [12].

rChiA74 $\Delta$ sp demostró habilidad similar para unir quitina a rChiA74 $\Delta$ sp-50 (CAT+DIQ). ChiA74 $\Delta$ sp-50 tiene una similar afinidad y actividad hidrolítica a la enzima madura. Por otro lado, los valores constantes cinéticos determinaron que el más alto  $V_{max}$  se obtuvo con rChiA74 $\Delta$ sp-60 (CAT/FnIII) usando 4-MU-GlcNAc3 fluorogénico [12].



**FIGURA 1: Estructura de *chiA74* y sus versiones truncadas.** A) *chiA74* completa (Chia74-74 kDa); B) Versión truncada de *chiA74* carente de péptido señal (Chia74 $\Delta$ sp-70 kDa); C) Versión truncada de *chiA74* carente de CBD (Chia74 $\Delta$ sp-60 kDa); D) Versión truncada de *chia74* carente de FnIII y CBD (Chia74 $\Delta$ sp- 50 kDa).. Modificado de E.O. Juárez-Hernández, 2017.

Basado en estos resultados, se desarrollaron cepas transformantes de *Bacillus thuringiensis* Cry-B con las construcciones *pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi* y *pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi*, para disminuir el gasto energético en la síntesis de la enzima, y con ello reducir los efectos secundarios no deseados. Así mismo, se confirmó la presencia del gen, y la síntesis de las versiones truncadas de *chiA74* y su actividad quitinolítica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la transformación genética se utilizó la cepa Cry-B de *Bt*. Se tomaron 4 pre-inóculos. Después de descongelar y centrifugar se desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de agua y 1  $\mu$ L de ADN plasmídico que contiene la construcción *pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi* en dos preinoculos y la construcción *pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi* en los otros dos. Se electroporaron los preinoculos y después se incubaron durante 2 hrs. a 37 °C. Se realizó el cultivo en placa de cada transformación, también la cepa Cry-B silvestre y una cepa que contenía el vector pHT3101 fueron sembrados en medio caldo tripsina-soya (TSB) suplementado con Eritromicina (25  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 28 °C.

Después se realizó PCR con taq polimerasa high fidelity thermo fisher scientific para confirmar la presencia del gen. Para extraer el ADN, se tomó una alícuota de bacterias y se resuspendió en agua. Se hirvió durante 10 min y luego se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm. Se colocó

1  $\mu$ L del sobrenadante y se agregó al mix de PCR. Se utilizaron los oligos PromChiRv/PstI (Forward: 5'CAAACTGCAGTTCTCCTTTCAAATAAAAAGATATATTTAAAG3'), TermRv/SphI (Reverse: ACATGCATGCCGAAAGCCTTTCCTAACAGG) y se sometieron a 30 ciclos en el termociclador (98 °C 30 s, 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s/Kb, 72 °C 5 min). Se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio a 120 V durante 20 min. Se empleó el marcador de peso GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder.

El cultivo en placa se incubó durante 5 días para inducir la esporulación. Posteriormente se tomó una muestra y se visualizaron por microscopía de contraste de fases.

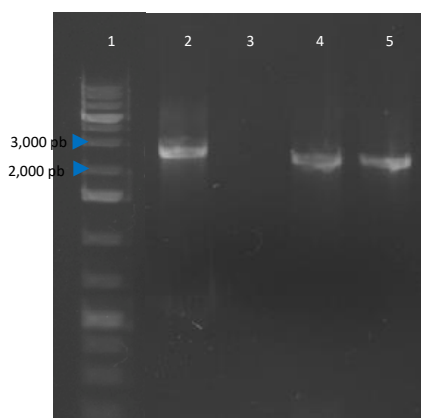
Una vez esporulados los cultivos, se procedió a preparar la muestra para electroforesis SDS-PAGE. Se recolectaron muestras en un tubo Eppendorf, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min y se retiró el sobrenadante para realizar lavados. Se repitió 3 veces. Después se agregaron 50  $\mu$ L de buffer de carga de Laemmly y se resuspendió el botón de células. Se hirvieron durante 10 min. Se centrifugaron de nuevo durante 10 min.

Los geles de poliacrilamida al 10% se prepararon con 4 mL de agua destilada, 3.3 mL de acrilamida 30%, 2.5 mL de Tris HCL pH 8.8 1 M, 100  $\mu$ L de SDS 10%, 100  $\mu$ L de PSA 10% y 12  $\mu$ L de TEMED. Para el concentrador se utilizaron 2.8 mL de agua destilada, 660  $\mu$ L de acrilamida 30%, 500  $\mu$ L de Tris HCl pH 6.8 1 M, 40  $\mu$ L de SDS 10%, 40  $\mu$ L de PSA 10% y 10  $\mu$ L de TEMED.

Se cargaron 10  $\mu$ L de sobrenadante de cada tubo Eppendorf en el gel, y se corrió la electroforesis a 120 V durante aprox. 1 hora. Se tiñó uno de los geles con azul de Coomassie y el otro fue preparado para Zimograma realizando lavados con buffer de caseína/EDTA, y equilibrando con buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0. Por último, fue cubierto con una sobrecapa de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 adicionando 100  $\mu$ L de 4-MU-Q+ (1 mg/mL). Visualizar en transiluminador con UV.

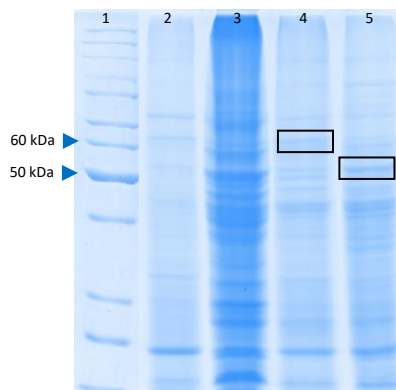
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas Cry-B de *Bt* fueron transformadas genéticamente con las construcciones pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi y pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi. Para corroborar la presencia del inserto, se realizó una PCR como se indica en la sección de métodos, obteniendo como resultado la confirmación de la presencia de los fragmentos en 3 de 4 colonias, 2 con la y pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi y una con pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi (Figura 2).

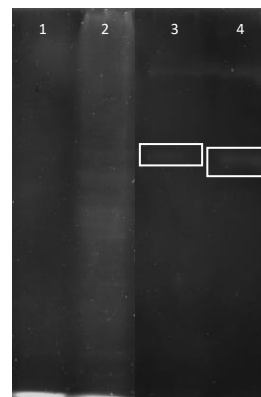


**FIGURA 2.- Presencia de las construcciones en cepas *Bt* Cry-B transformadas.** 1) Marcador de peso; 2) Cepa transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi, fragmento de 2,600 pb aprox. 3) Cepa con resultado negativo a pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi. 4 y 5) Cepas transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi, fragmento de 2,300 pb aprox.

Una vez esporulados los cultivos de las bacterias transformadas, confirmamos la síntesis de las versiones truncadas de chiA74, obteniendo pequeñas cantidades de proteína (Figura 3), debido a que el promotor empleado es de tipo silvestre. La actividad quitinolítica fue evaluada realizando un zimograma, en donde se pudo apreciar mediante fluorescencia un par de bandas tenues de cada cepa transformada, de las cuales una corresponde a la versión truncada insertada, y la otra a las quitinasas que la bacteria produce de manera normal. Esto pone en evidencia la actividad quitinolítica de las versiones truncadas (Figura 4). Esto coincide con lo reportado por Juárez-Hernández (2017).



**FIGURA 3.- integridad de la síntesis de las proteínas con las versiones truncadas CAT/FnIII y CAT+DIQ de chiA74.** 1) Marcador de peso (kDa); 2) Cepa Cry-B *Bt* silvestre; 3) Cepa transformada con el vector pHT3101; 4) Cepa transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi, banda de 60 kDa (señalada); 5) Cepa transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi, banda de 50 kDa (señalada).



**FIGURA 4.- Actividad quitinolítica de las versiones truncadas CAT/FnIII y CAT+DIQ de chiA74.** 1) cepa silvestre Cry-B de *Bt*; 2) Cepa transformada con el vector pHT3101, 3) Cepa transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT/FnIII-Term.chi.; (CAT/FnIII con actividad quitinolítica señalada) 4) Cepas transformada con la construcción pchiA-pHT3101-CAT+DIQ-Term.chi. (CAT+DIQ con actividad quitinolítica señalada).

## CONCLUSIONES

Mediante transformación genética, la cepa Cry-B de *Bacillus thuringiensis* es capaz de expresar las versiones truncadas de ChiA74 y mostrar actividad quitinolítica tanto para CAT-FnIII como CAT+DIQ.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de veranos UG, Universidad Autónoma de Sinaloa y a Isamar Sanchez Vargas por proporcionar las construcciones utilizadas.

## REFERENCIAS

- 1.- Ibrahim, Griko, Junker and A. Bulla. (2010). *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs* 1:1, 31-50.
- 2.- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000). Safety and benefits of plants protected with *Bacillus thuringiensis* for the control of insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 156-173.
- 3.- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62: 775-806.
- 4.- Soberon M, Pardo L, Muñoz Garay C, Sánchez J, Gómez I, Porta H, Bravo A (2010) Chapter 11. Pore formation by crying toxins. In: Anderluh G, Lakey J, (eds) *proteins: membrane binding and pore formation. Bacillus Thuringiensis Biotechnology*, Estibaliz Sansin. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, NY
- 5.- Estibaliz sansinenea (2012) *Bacillus thuringiensis* biotechnology, editado por estibaliz sansinenea) Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, NY.
- 6.- J. Gassmann, L. Petzold-Maxwell, H. Clifton, W. Dunbar, M. Hoffmann, A. Ingber, and S. Keweshan (2014). Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *PNAS*; 14; 5141–5146.
- 7.- A. Nagpure, B. Choudhary, R.K. Gupta. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34; 215–232.
- 8.- Honda, Kunii, Nohara, Wakita, Sugahara, Kawakita, Oyama and Sakaguchi (2017). Characterization of a *Bacillus thuringiensis* chitinase that binds to cellulose and chitin. *AMB Expr* 7:51.
- 9.- Fuente-Salcido, Casados-Vázquez, García-Pérez, Barboza-Pérez, Bideshi, Salcedo-Hernández, García-Almendarez, Barboza-Corona. (2016) The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiology Open*, 5;819–829.
- 10.- Barboza-Corona, Delgadillo-Ángeles, Castañeda-Ramírez, Barboza-Pérez, Casados-Vázquez, Bideshi, Rincón-Castro, (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 as a factory to synthesize alkali-labile ChiA74 $\Delta$ sp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use. *Microb. Cell Fact.* 24;13-15.
- 11.- Barboza-Corona, Nieto-Mazzocco, Velázquez-Robledo, Salcedo-Hernández, Bautista, Jiménez, Ibarra. (2003) Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69;1023–1029.
- 12.- Juárez-Hernández, Casados-Vázquez, K. Bideshi, Salcedo-Hernández, Barboza-Corona. (2017). Role of the C-terminal and chitin insertion domains on enzymatic activity of endochitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 102; 52–59.