

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

Sánchez Vargas Perla Isamar (1), Barboza Corona José Eleazar (2)

1 [Lic. en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [isa1993sv@gmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Guanajuato Institución] | [josebar@ugtomx.onmicrosoft.com]

## Resumen

*Bacillus thuringiensis* es el bioinsecticida más conocido y empleado del mundo. Su actividad se debe principalmente, al efecto de proteínas Cry y Cyt, las cuales actúan de manera sinérgica con otras biomoléculas tales como quitinasas, proteínas insecticidas vegetativas, proteasas, parasporinas y bacteriocinas. Las quitinasas, en particular, son secretadas por *B. thuringiensis* para hidrolizar la quitina para su uso como fuentes de carbono y nitrógeno. ChiA74, una endoquitinasa de *B. thuringiensis*, tiene una estructura modular que incluye una secuencia de péptido señal de secreción (sp), y los dominios catalítico (CD), de inserción de quitina (CID), fibronectina de tipo III (FnIII) y de unión a quitina (CBD). Por medio de técnicas de PCR y ligación de los productos generados, además del uso de enzimas de restricción, se generaron dos versiones truncadas de chiA74 sin péptido señal que, además carecen respectivamente de los dominios CBD y CDB – FnIII, las cuales se clonaron en la cepas Top 10 y ET-1256 de *E.coli* y, finalmente en HD1 de *B. thuringiensis* para su caracterización por medio de geles de poliacrilamida para proteínas y zimogramas con el fin de analizar la actividad enzimática de ambas versiones truncadas de la endoquitinasa, obteniendo como resultado la expresión de ambas.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* is the world's best known and used bioinsecticide. Its activity is mainly due to the effect of the proteins Cry and Cyt, which act synergistically with other biomolecules such as chitinases, vegetative insecticidal proteins, proteases, parasporins and bacteriocins. Chitinases, in particular, are secreted by *B. thuringiensis* to hydrolyze chitin for use as carbon and nitrogen sources. ChiA74, a *B. thuringiensis* endo-chitinase, has modular structure that includes a secretion signal peptide (sp) sequence, and catalytic (CD), chitin insertion (CID), fibronectin type-III (FnIII) and chitin binding (CBD) domains. By means of PCR techniques and ligation of the generated products, in addition to the use of restriction enzymes, two truncated versions of chiA74 without signal peptide were generated which, in addition they lack respectively the CBD and CDB-FnIII domains, which were cloned in *E.coli* Top 10 and ET-1256 strains and, finally in HD1 of *B. thuringiensis* for its characterization by means of polyacrylamide gels for proteins and zymograms in order to analyze the enzymatic activity of the two truncated versions of the endochitinase, resulting in the expression of both,

### Palabras Clave

Cry; Cyt; Endoquitinasa; CID; CID-FnIII

## INTRODUCCIÓN

### Propiedades entomopatógenicas de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria insecticida, gram positiva, cuya actividad se basa en el efecto de proteínas Cry o Cyt producidas durante la fase de esporulación en cuerpos paraesporales, las cuales tienen su efecto tóxico en las células epiteliales del intestino medio de los insectos y actúan de manera sinérgica con otras biomoléculas, tales como quitinasas, proteínas insecticidas vegetativas, proteasas, parasporinas y bacteriocinas [1][2].

En particular, los cuerpos parasporales de *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (HD1) y *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis*, son tóxicos para las larvas de lepidópteros y dípteros, respectivamente. Éstos se encuentran entre los bioinsecticidas más exitosos utilizados en todo el mundo. [3].

### El papel de las endoquitinasas

El intestino medio del insecto está recubierto internamente por la membrana peritrófica, cuya estructura está compuesta principalmente de proteínas y reforzada con fibras de quitina. Ésta es una barrera física contra las infecciones bacterianas y/o virales, pero permite el flujo de nutrientes digeridos, minerales y agua hacia el epitelio del intestino medio. Se sabe que la aproximación de las  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry y Cyt) de *B. thuringiensis* al receptor de las microvellosidades del intestino se facilita en gran medida cuando la membrana peritrófica se daña o degrada, provocando un aumento de su actividad insecticida [4].

Las quitinasas, en particular, son secretadas por *B. thuringiensis* para hidrolizar la quitina con el fin de emplearla como fuente de carbono y nitrógeno [1]. Éstas enzimas se producen generalmente a un nivel notablemente más bajo que las toxinas Cry y Cyt, por lo que, a diferencia de éstas, las quitinasas no se acumulan naturalmente como

inclusiones intracelulares en las células bacterianas, lo cual resulta una desventaja para las formulaciones comerciales eficientes [3].

Hasta ahora, el efecto sinérgico de las quitinasas purificadas de *B. thuringiensis* y las proteínas Cry no se ha demostrado cuantitativamente, debido principalmente a los bajos niveles de expresión de estas enzimas. Esta es una razón importante para clonar y sobreexpresar los genes endógenos para que su posible efecto sinérgico pueda ser probado [4].

La endoquitinasa ChiA74 es una enzima soluble, producida y secretada por *Bacillus thuringiensis* que sinergiza la entomotoxigenidad de las proteínas Cry [3].

- Estructura de ChiA74

ChiA74 tiene una estructura modular que incluye una secuencia de péptido señal de secreción (sp), y los dominios catalítico (CD), inserción de quitina (CID), fibronectina de tipo III (FnIII) y de unión a quitina (CBD).

El objetivo a largo plazo de este trabajo consiste en producir inclusiones de ChiA74 en *B. thuringiensis* y determinar su efecto sobre la producción de cristales Cry, la esporulación y la toxicidad. Para ello se generaron dos versiones truncadas de la endoquitinasa que carecen respectivamente de los dominios CBD y CDB – FnIII (Imagen 1A), además se suprimió la secuencia de codificación del péptido señal de secreción y se expresaron bajo su promotor nativo empleando el plásmido pHT3101 para su clonación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Generación de las versiones truncadas de ChiA74 y clonación en el vector pHT3101.*

Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para generar dos versiones truncadas de la endoquitinasa (ver tabla 1) y se mandaron sintetizar en la empresa T4Oligo. Los oligonucleótidos contenían el sitio de corte de la enzima de restricción Pst1. Además, se emplearon oligonucleótidos para amplificar el promotor y

terminador nativo de ChiA74. Para las reacciones de PCR se empleó la *Taq* DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μL, 500 U de Thermo Scientific.

Fragmento generado	Secuencia del oligonucleótido
PromChi	R:5'CAAACTGCAGTTCTCCTTTCAAATAAAAAGAT ATATTTAAAG3'
TermChi	R:5'ACATGCATGCCGAAAGCCTTTCCTAACAGG 3'
CAT-CID-FnIII	D:5'AACTGCAGGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAAA 3'
	R:5'AACTGCAGATTAGCTTCATCCGTTTTGACAGTA AGAGC3'
CAT+CID	D:5'AACTGCAGGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAAA 3'
	R:5'AACTGCAGCTCAGTATCTTTTGATTAATAGT CC3'

Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores empleados para la generación de las versiones truncadas de ChiA74.



Figura 1: Organización estructural de ChiA74. A) Dominios de la quitinasa. C) Versión truncada de ChiA74 sin el dominio CBD. D) Versión truncada de ChiA74 sin los dominios CBD-FnIII. Las flechas indican los oligonucleótidos empleados para la amplificación, véase la tabla 1. Modificado de E.O. Juárez-Hernández, 2017.

Posteriormente, los productos obtenidos de la PCR se clonaron en el vector pHT3101 y se transformaron células electrocompetentes Top 10 de *E.coli*. Se seleccionaron colonias y se extrajo el ADN plasmídico por el método de CTAB. Para corroborar la presencia de cada una de las versiones truncadas, el ADN plasmídico se digirió durante 2 horas con la enzima PstI. Una vez que se confirmó la presencia de ambas versiones, se

procedió a clonar el terminador y se realizó el mismo procedimiento, a excepción de que para corroborar su presencia, el ADN plasmídico se digirió con la enzima de restricción SphI.

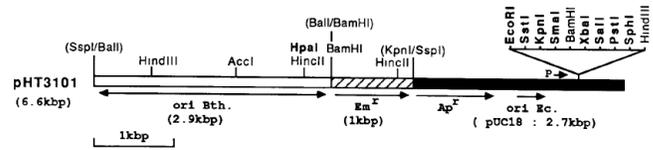


Figura 2: Vector de clonación pHT3101. D. Lereclus, 1989.

Transformación de células electrocompetentes ET-1256 de *E.coli* y HD1 de *Bacillus thuringiensis*.

Una vez generadas ambas construcciones pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi y pchiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi, se procedió a transformar células electrocompetentes ET-1256 de *E.coli*. Se extrajo el ADN plasmídico de algunas colonias para corroborar la presencia de las construcciones, y una vez confirmada, se procedió a transformar con las construcciones células electrocompetentes HD1 de *Bacillus thuringiensis*.

Visualización de las versiones truncadas de ChiA74 en gel de poliacrilamida y de su actividad en zimograma.

Se realizó PCR de colonia para corroborar la presencia de ambas construcciones en las células HD1 y, posteriormente, se sembraron en placas de caldo nutritivo suplementado con eritromicina 25 mg/mL y se incubaron a 28°C hasta la esporulación.

Una vez completada la etapa de esporulación se prepararon las muestras para la electroforesis SDS-PAGE. Se recolectaron muestras en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min y se decantó el sobrenadante para realizar 3 lavados con agua destilada. Posteriormente, se añadieron 50 μL de buffer de carga de Laemmly y se resuspendió el botón de células en vórtex. Se procedió a hervir las muestras durante 10 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos.

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 μL de SDS 10%, 100 μL de PSA 10% y 12 μL de

TEMED. Para el concentrador se utilizaron 2.8 mL de agua destilada, 660 µL de acrilamida 30%, 500 µL de Tris HCl pH 6.8 1 M, 40 µL de SDS 10%, 40 µL de PSA 10% y 10 µL de TEMED.

Se cargaron 10 µL de sobrenadante de cada tubo eppendorf en el gel, y se corrió la electroforesis a 120 V durante un tiempo aproximado de 1 hora. Uno de los geles se tiñó 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, se cubrió 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 µL de 4-MU-Q+ (1 mg/mL). La visualización del zimograma se realizó en ChemiDoc™ MP de BioRad con UV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Generación de las versiones truncadas de ChiA74 y clonación en el vector pHT3101.*

Se logró amplificar los fragmentos CAT-CID y CAT-CID-FnIII del gen de ChiA74 y el terminador nativo.

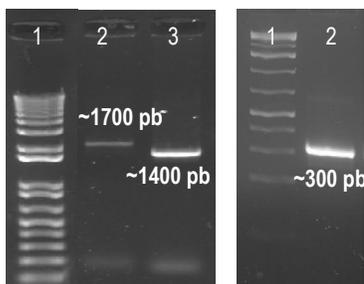


Figura 3: A) Amplicones de CAT-CID de ChiA74, carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: amplicones de CAT-CID con un tamaño de 1410 pb, carril 3: Amplicones de CAT-CID-FnIII con un tamaño de 1740 pb. B) Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1KB Plus DNA Ladder, carril 2: Amplicón de TermChi de ChiA74 con un tamaño aprox. de 300 pb.

*Transformación de células electrocompetentes Top 10 y ET-1256 de E.coli.*

Se logró transformar células Top 10 y ET-1256 de *E.coli* con las dos versiones truncas de la endoquitinasa ChiA74 de manera independiente.

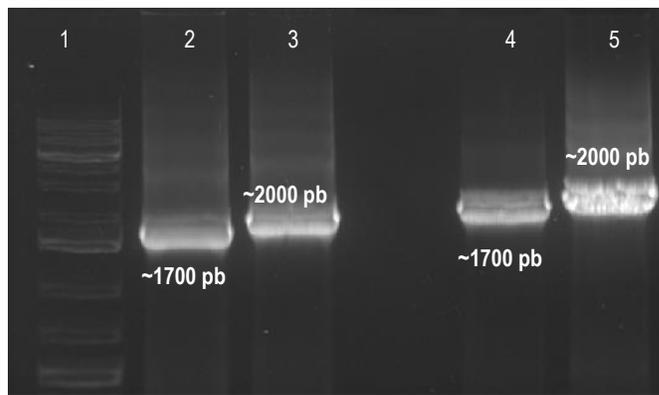


Figura 4: PCR del ADN plasmídico extraído de las transformantes de células electrocompetentes Top 10 y ET-1256 de *E.coli* con las versiones truncas de ChiA74 clonadas en el vector pHT3101. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1KB Plus DNA Ladder, carril 2: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi en ET-1256 de *E.coli*, carril 3: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi en ET-1256 de *E.coli*, carril 4: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi en Top 10 de *E.coli*, carril 5: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi en Top 10 de *E.coli*.

*Transformación de células electrocompetentes HD1 de Bacillus thuringiensis.*

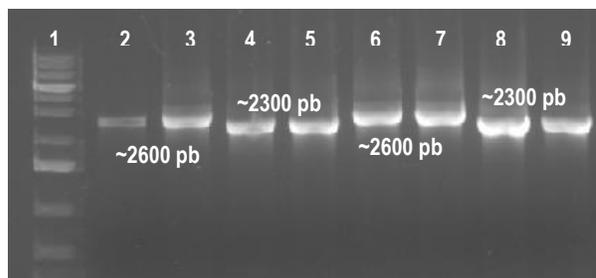


Figura 5: PCR de las versiones truncadas de ChiA74, clonadas en la cepa HD1 de *Bacillus thuringiensis*. Carril 1: Marcador molecular GeneRuler 1KB Plus DNA Ladder, carriles 2, 3, 6 y 7 construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi, carriles 4, 5, 8 y 9, construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi.

Visualización de las versiones truncadas de ChiA74 en gel de poliacrilamida y de su actividad en zimograma.

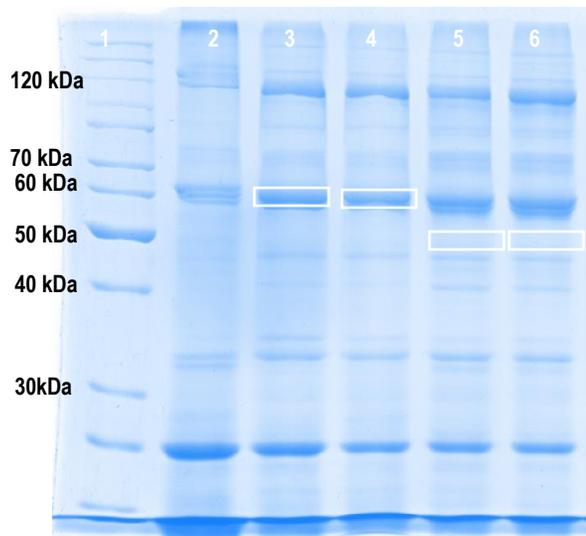


Figura 6: Gel de poliacrilamida para la visualización de las versiones truncadas de ChiA74. Carril 1: Marcador de proteínas PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Carril 2: HD1 cepa silvestre. Carriles 3 y 4: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi. Carriles 5 y 6: Construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi.

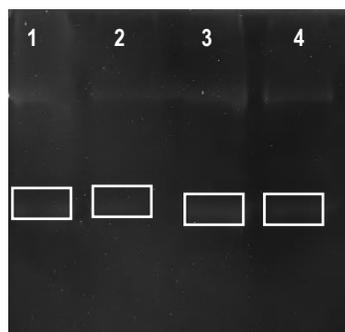


Figura 7: Zimograma para medir la actividad quitinolítica de las versiones truncadas de ChiA74. Carriles 1 y 2: construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-FnIII-TermChi. Carriles 3 y 4: construcción pChiA-pHT3101-CAT-CID-TermChi.

Los resultados obtenidos tanto en el gel de poliacrilamida como en el zimograma, sugieren que, efectivamente, la expresión de la quitinasa bajo condiciones nativas, es baja, sin embargo, al escindir la región codificante para el péptido señal de secreción, se logró inducir la formación de cuerpos de inclusión de las dos versiones truncadas de ChiA74.

## CONCLUSIONES

Se logró generar cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* que expresan dos versiones truncadas de la endoquitinasa ChiA74 y además, se logró observar mediante un zimograma la actividad quitinolítica de ambas versiones truncadas.

## AGRADECIMIENTOS

A toda la organización de los Veranos UG 2017, al Doctor José Eleazar Barboza Corona, por brindarme la oportunidad de formar parte de los veranos UG 2017 con este proyecto. A las Maestras en Biociencias Karen Estefanía González Ponce y Estefanía O. Juárez Hernández por el diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la generación de las versiones truncadas de la endoquitinasa ChiA74 por medio de PCR.

## REFERENCIAS

- [1] Juárez Hernández, S. O., Casados Vázquez, L. E., Bideshi, B. K., Salcedo Hernández, R., & Barboza Corona, J. E. (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.
- [2] Soberón, M., & Bravo, A. (2001) Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación, 14,303-314. Recuperado de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_27.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf)
- [3] Barboza Corona, J. E., Delgadillo Ángeles, J. L., Castañeda Ramírez, J. E., Barboza Pérez, U. E., Casados Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & del Rincón Castro, Ma. C. (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. *Microbial Cell Factories*.
- [4] Barboza Corona, J. E., Nieto Mazzocco, E., Velázquez Robledo, R., Salcedo Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, M., & Ibarra, J. E. (2003). Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1023-1029.
- [5] Lereclus, D., Arantés, O., Chauvaux, J., & Lecadet, M. M. (1989). Transformation and expression of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 60, 211-218.