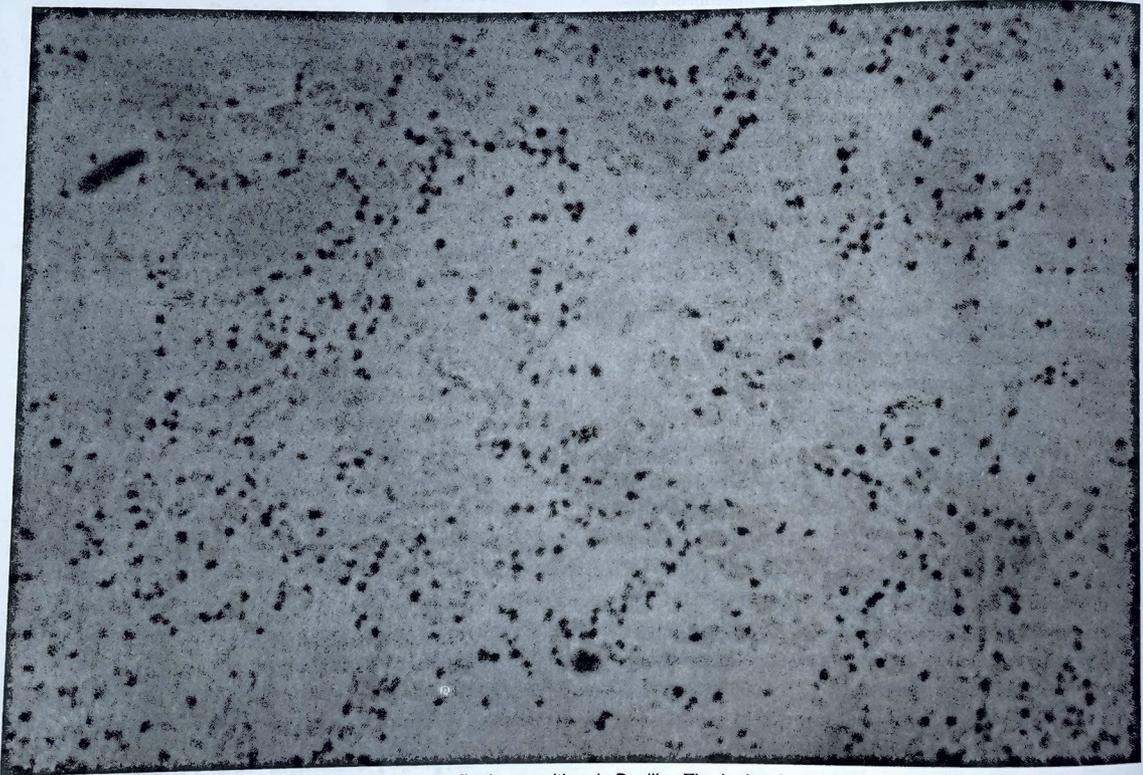


UNA ESTRATEGIA PARA ENCONTRAR MUTACIONES



Microfotografía de un cultivo de *Bacillus Thuringiensis*.
Fotografía: Silvia Gómez Daza.

Estandarización de la técnica LSSP-PCR para la identificación de nuevos genes *cry1* en *Bacillus thuringiensis*

López Alejandro¹, Hernández Javier², Bernal Jaime³

1. Aspirante a M.Sc. Pontificia Universidad Javeriana.

2. Asesor Centro de Estudios en Biología Molecular, Gimnasio Campestre.

3. Director Centro de Estudios en Biología Molecular, Gimnasio Campestre.

RESUMEN

PCR con un único oligonucleótido específico en baja astringencia (LSSP-PCR) es una técnica simple que detecta mutaciones en fragmentos de DNA. Este ensayo se ha aplicado a genes *cry1* de *Bacillus thuringiensis*. Una primera reacción de PCR se lleva a cabo con oligonucleótidos altamente específicos. El producto de amplificación es purificado del gel y es sometido a PCR utilizando altas concentraciones de un único oligonucleótido específico, grandes cantidades de Taq polimerasa y muy baja temperatura de anillaje. Se obtiene un complejo patrón de bandeos característico del gen en estudio. La optimización de LSSP-PCR se hizo usando el método de Taguchi donde se aplica un diseño experimental basado en arreglos ortogonales. La metodología empleada en este trabajo abre el camino para la búsqueda de nuevas variantes de los genes *cry*.

Palabras clave: LSSP-PCR; *cry1*; Método de Taguchi.

SUMMARY

Low stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR) is a simple technique that detects mutations in DNA fragments. This approach has been applied to *Bacillus thuringiensis cry1* genes. A purified DNA fragment is subjected to PCR using high concentrations of a single specific primer, large amounts of Taq polymerase and a very low annealing temperature. A complex banding pattern is obtained. The optimization strategy for LSSP-PCR was done using the Taguchi method. The methodology used opens the way to the search of new *cry* gene variants.

Key words: LSSP-PCR; *cry1*; Taguchi method.

INTRODUCCIÓN

Para el microbiólogo, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es un bacilo ubicuo que se caracteriza por sintetizar durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento una inclusión paraesporal de naturaleza proteica (ICPs) responsable de la acción insecticida sobre un gran número de órdenes de insectos considerados como plagas en la agricultura. Las diferentes ICPs son codificadas por genes denominados *cry*. La diversidad de estos genes se pone de manifiesto si se considera que hoy en día existen reportadas más de 300 variantes de ellos. Entre este conjunto se destacan los genes *cry1* que tienen amplia especificidad sobre insectos lepidópteros y algunos dípteros.

La búsqueda de nuevos genes insecticidas es una labor encomiable que pretende encontrar nuevas especificidades y mayores niveles de ellas. Se han propuesto metodologías como los bioensayos, engorrosos cuando se trata de caracterizar un gran número de cepas, y la electroforesis de proteínas, que no indica variantes de un gen determinado a menos que se determine la secuencia de la proteína (Chestukhina *et al.* 1994; Ranasinghe y Akhurst, 2002). La hibridación con sondas tiene el inconveniente de requerir un gran número de ellas para abarcar todas las posibles variantes ya que la metodología necesita gran especificidad sobre la secuencia objetivo de DNA (Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido explotada en la caracterización de cepas de *Bt*. Para la búsqueda de nuevos genes se han postulado algunas variantes de esta técnica (Carozzi *et al.*, 1991; Cerón *et al.*, 1995; Ben-Dov *et al.*, 1997; Kalman *et al.* 1993; Kuo y Chak, 1996; Juárez-Pérez *et al.*, 1997).

Cuando se trabaja en PCR, siempre se trata de evitar el anillaje de los oligonucleótidos en regiones a las cuales no son exactamente complementarios. Sin embargo se ha visto que el anillaje sobre secuencias con baja complementariedad puede ser útil. Este tipo de anillaje ha llevado al desarrollo de técnicas para el estudio de polimorfismos de DNA. Una de ellas es la técnica denominada PCR con un solo iniciador en baja astringencia (LSSP-PCR), que cuando se aplica a fragmentos de por lo menos 1 kb de tamaño, traslada la secuencia de DNA a un multibandeo denominado «señal genética». Cambios en una base alteran significativamente la señal produciendo patrones que son diagnósticos de la alteración en particular (Pena *et al.*, 1994).

Aquí se presenta la estandarización de LSSP-PCR para la búsqueda de nuevos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* de *Bt*. Inicialmente se determinó una región variable dentro de cada secuencia para el diseño de oligonucleótidos específicos que permitieran obtener amplificaciones cuyos patrones electroforéticos fueran característicos de cada una de ellas. Aunque la amplificación de segmentos de DNA de *Bt* por PCR está bien documentada (Porcar y Juárez-Pérez, 2003), la implementación de protocolos entre diferentes termocicladores y el desarrollo de nuevas aplicaciones necesita de investigación en cuanto al rango de reacción de los componentes, cuya suma puede alterar la magnitud, especificidad o fidelidad de esta herramienta molecular. La optimización generalmente conlleva la investigación secuencial de cada variable de la reacción, lo que implicaría un gran número de experimentos para incluir todas las posibles combinaciones. Para solucionar este problema se utilizó el diseño experimental de Taguchi aplicado a la optimización de PCR descrito por Cobb y Clarkson (1994). La base de este procedimiento consiste en la identificación de las variables que influyen en la reacción y la definición de diferentes niveles (factores control) de cada una de ellas; con estas se predice una combinación, utilizando los arreglos ortogonales de Taguchi, que puede llevar a una calidad óptima de la reacción. Si los resultados son satisfactorios no se necesitan más experimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de referencia

Como cepa de referencia se utilizó *Bt* var. *kurstaki* HD-1, proveniente del producto comercial Dipel (Aventis CropScience). Esta cepa contiene los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ba*, *cry1IA*. Para la extracción del DNA plasmídico requerido en la reacción de amplificación de genes *cry1* se empleó el método de M. He. (1990).

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron tomando como punto de partida las secuencias de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para Información en Biotecnología (National Center for Biotechnology Information-NCBI). Los números de acceso se encuentran en la página referente a la nomenclatura de las toxinas (www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (European Bioinformatics Institute-www.ebi.ac.uk/clustalw). Una vez que las secuencias fueron alineadas, se seleccionó una región específica de cada gen que presentara variabilidad en un fragmento de secuencia de aproximadamente 1 kb para cada uno de ellos.

Con base en estas regiones se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos iniciadores que reconocieran el grupo de genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. Para ello se utilizó el programa PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Las parejas de oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta las siguientes reglas: no poseer secuencias repetidas o complementarias en los extremos 5' y 3', presentar una diferencia en la temperatura de fusión igual o inferior a 1°C entre los miembros de una pareja, presentar un contenido de citosina-guanina entre 40 y 50% y que generen un producto entre 1 y 1.1 kb. Así mismo se buscó que su tamaño estuviera entre 18 y 27 bases, que no tuviesen más de 3 bases iguales consecutivas y que tuvieran citosina o guanina en sus extremos 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.

Los oligonucleótidos diseñados se probaron utilizando el programa de PCR virtual (http://www.ch.embnet.org/software/iPCR_form.html). Este programa está diseñado para hacer ampliificaciones virtuales con oligonucleótidos diseñados con el programa PRIMER3. Estas pruebas se hicieron con las secuencias de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* para asegurar que todas amplificaran.

PCR

En este estudio se determinaron inicialmente como «factores control» el DNA, la concentración de $MgCl_2$, la concentración de Taq polimerasa y la temperatura de anillaje. Se ensayaron 3 concentraciones de DNA plasmídico. Para el caso del $MgCl_2$ y la Taq polimerasa se ensayaron 3 concentraciones. En cuanto a la temperatura de anillaje, se evaluaron 3 temperaturas diferentes (Tabla 1). El arreglo ortogonal utilizado se presenta en la tabla 2. La amplificación fue realizada en un termociclador Omn-E (Hybaid, Reino Unido). Las condiciones de la reacción se indican en la tabla 3 (se usaron reactivos de PCR Promega).

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente (250 voltios por 25 minutos) en gel de agarosa 0.8% (teñido con bromuro de etidio) empleando buffer TBE 0.5X (Tris-HCl 445 mM, ácido bórico 445 mM, EDTA 12.5 mM pH 8.2). La reacción fue visualizada en transiluminador de luz ultravioleta y los tamaños se determinaron con un marcador de peso de 1 kb (Invitrogen).

Ensayo	Variable	Valor a probar
1	$MgCl_2$	1.5 mM (A) 2.0 mM (B) 3.0 mM (C)
2	DNA	10 nanogramos (na) (A) 50 na (B) 100 ng (C)
3	Taq polimerasa	1 U (A) 1.5 U (B) 2.0 U (C)
4	Temperatura de anillaje	51°C (A) 52°C (B) 53°C (C)

Tabla 1. Variables evaluadas en la estandarización de PCR

Experimentos	Variables
	1 2 3 4
1	AAAA
2	ABBB
3	ACCC
4	BABC
5	BBCA
6	BCAB
7	CACB
8	CBAC
9	CCBA

Tabla 2. Arreglo ortogonal para 4 variables en 3 niveles

Mezcla de reacción (25 µL)	Programa de PCR
200µM de dNTPs 2.0 mM de MgCl ₂ Buffer de PCR 1X 1 µM de oligonucleótidos 100 ng de DNA 2.0 U de Taq DNA polimerasa	Denaturación inicial a 94°C por 5 minutos 94°C por un minuto 53°C por 30 segundos → 35 ciclos 72 grados por 1 minuto Extraextensión a 72°C por 5 minutos.

Tabla 3. Condiciones de PCR

Ensayo	Variable	Concentración a probar
1	Oligonucleótido	1.0 µM (A) 3.0 µM (B) 5.0 µM (C)
2	DNA	1 µL (A) 2 µL (B) 3 µL (C)
3	Taq polimerasa	2 U (A) 4 U (B) 8 U (C)
4	Temperatura de alineamiento	30°C (A) 35°C (B) 40°C (C)

Tabla 4. Condiciones evaluadas para los factores control de LSSP-PCR

Mezcla de reacción (25 µL)	Programa de LSSP-PCR
2 µL de DNA molde 8 unidades de Taq polimerasa 5.0 µM de uno de los 2 iniciadores 200 µM de dNTPs 2.0 mM de MgCl ₂ Buffer de PCR 1X	Denaturación por 5 minutos a 94°C 94°C por un minuto }35 ciclos 40°C por un minuto

Tabla 5. Condiciones de LSSP-PCR

LSSP-PCR

Los productos de la reacción de PCR fueron extraídos del gel de agarosa cortando la banda y diluyéndola en 10 partes de agua, calentando la mezcla a 95°C y dejándola enfriar a temperatura ambiente (agitando constantemente para evitar la solidificación de la agarosa). De esta mezcla se tomó el DNA molde para la reacción de LSSP-PCR, la cual se llevó a cabo con todos los oligonucleótidos.

En la reacción de LSSP-PCR se determinaron como factores claves que influyen en la calidad de la reacción: 1- cantidad de DNA a utilizar (obtenida de la PCR anterior), 2- concentración del oligonucleótido, 3- concentración de Taq polimerasa y 4- temperatura de anillaje. El arreglo ortogonal utilizado se presenta en la tabla 2. Las condiciones a ensayar se presentan en la tabla 4. Las condiciones de reacción de LSSP-PCR se muestran en la tabla 5. Los productos fueron visualizados en gel de agarosa 1%.

Resultados y discusión

En esta investigación se propuso diseñar oligonucleótidos altamente específicos para amplificar una región variable de aproximadamente 1000 bp del gen objetivo, que permitiera su utilización en la reacción de LSSP-PCR. Como medida inicial se realizaron alineamientos de todos los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* con el fin de determinar una región variable en el centro del gen que permitiera, al emplear LSSP-PCR, una buena probabilidad de encontrar divergencias características de un nuevo gen, y una región conservada en los extremos para lograr un diseño de oligonucleótidos específicos de cada tipo de genes estudiados. Dado el alto porcentaje de homología (95%) entre los 3 grupos de genes (Crickmore *et al.*, 1998), se ubicaron varias regiones que pueden servir para el diseño de oligonucleótidos y el subsecuente análisis por LSSP-PCR. La región seleccionada después del alineamiento se utilizó para el diseño de oligonucleótidos con el programa PRIMER 3.

Una vez se tuvieron varias opciones de oligonucleótidos que pudiesen ser útiles en LSSP-PCR, se procedió a evaluarlos con la herramienta virtual de PCR. Gracias a este análisis se pudieron determinar las parejas de oligonucleótidos que presentaron las mejores características (especificidad, capacidad para amplificar un producto de aproximadamente 1000 bp y temperaturas de fusión similares). Al final se seleccionaron 3 pares de oligonucleótidos específicos para los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. Aunque estos oligonucleótidos fallaron al amplificar los genes *cry1Aa6*, *cry1Ab2*, *cry1Ab10*, *cry1Ac3*, *cry1Ac6* y *cry1Ac13*, presentaron una gran especificidad de secuencia y de producto amplificado para los demás genes (tablas 6 y 7).

Oligonucleótidos	Gen reconocido	Tamaño del producto	Secuencia 5'-3'
Aa1	Grupo de genes <i>cry1Aa</i>	1033	1.TTCGCATTCCTTTATTGG
Aa2			2.TAAGTCGCTTCGCATGTTT
Ab1	Grupo de genes <i>cry1Ab</i>	1084	1.CGTTAAAGGACCAGGATTACAG
Ab2			2.TGCTTCTCCTACTAATGTTTCTC
Ac1	Grupo de genes <i>cry1Ac</i>	1029	1.AAGTTCCAATTCACCTCCCATC
Ac2			2.GCCCATCTTGCGCTTAAATC

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes *cry1*.

Oligonucleótido	Longitud	Temperatura de fusión	Contenido G-C
Aa1	20	59.90	40.00
Aa2	20	60.01	45.00
Ab1	23	59.11	43.48
Ab2	24	58.19	41.67
Ac1	22	59.33	40.91
Ac2	20	59.67	50.00

Tabla 7. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*.

Cuando se van a realizar perfiles de LSSP-PCR, la especificidad y cantidad del producto de amplificación que se usará como DNA molde son variables de suma importancia puesto que de no ser controladas se dificulta conseguir resultados buenos y reproducibles (Pena, 2004; Barreto, 2004). Por ello fue necesario optimizar la reacción de PCR, para lo que se utilizó el método de Taguchi modificado, aplicado a PCR (Cobb y Clarkson, 1994).

Al analizar todos los cambios que se observaron en las reacciones, se pudo concluir que:

- La cantidad de DNA con la cual se obtuvieron las mejores amplificaciones fue 100 ng.
- Las concentraciones de 2.0 y 3.0 mM de $MgCl_2$ evitaban que se diese la presencia de bandas inespecíficas, contrario a lo que ocurrió cuando se utilizó la concentración de 1.5mM.
- En cuanto a la Taq polimerasa se observó que con las concentraciones de 1.0 y 1.5 U no se presentó una buena cantidad de producto de amplificación; con el experimento 3 se determinó que el aumento a 2.0 U produjo buenas amplificaciones y no se generaron bandas inespecíficas.
- La temperatura de anillaje que mejor funcionó fue 53°C y en el experimento 8 se observa una amplificación específica.

Dado este análisis, se realizó un nuevo experimento donde se utilizaron 100 ng de DNA, 2.0 mM de $MgCl_2$ (aunque 2.0 y 3.0 mM dieron buenos resultados se escogió 2.0 mM ya que se ha descrito que concentraciones altas de esta molécula pueden generar productos indeseados), 2.0 U de Taq polimerasa y 53°C como temperatura de anillaje. Los resultados permitieron obtener amplificaciones específicas y de buena magnitud. Ante la posibilidad de que se estuviesen generando productos inespecíficos de PCR, los cuales quizás no pudieran ser observados en el gel de agarosa debido a su baja concentración, se redujo el tiempo de anillaje a 30 segundos para que el oligonucleótido tuviese una menor probabilidad de alinearse de manera inapropiada con el DNA molde. Este cambio no demostró afectar la magnitud de la amplificación (Figura 1). Dado que la medición de los resultados se hizo de manera cualitativa, no se realizaron cálculos adicionales.



Figura 1. PCR optimizada con el método de Taguchi. 1: marcador de peso de 1 kb.; 2 y 3: *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1, tiempo de alineamiento 1 minuto; 4 y 5: *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1, tiempo de alineamiento 40 segundos.

Un fragmento de aproximadamente 1000 bp fue amplificado en la primera reacción de PCR para todas las cepas nativas usadas en esta investigación, utilizando las parejas de oligonucleótidos Aa, Ab y Ac. Estos fragmentos se caracterizaron por LSSP-PCR con los oligonucleótidos Aa1 o Aa2, Ab1 o Ab2 y Ac1 o Ac2. Se comenzó por evaluar si la técnica era reproducible en la generación de señales genéticas a partir de productos de PCR provenientes de genes *cry1* y las condiciones a las cuales se generaría este patrón electrofóretico. Como «factores control» se determinaron los componentes que causan el mayor efecto en la técnica, como las bajas temperaturas para el alineamiento, las altas concentraciones de Taq polimerasa e iniciador y el DNA molde que se extrae del gel de agarosa (Pena *et al.*, 1994). En primera instancia se extrajo la banda amplificada del gel de agarosa. Estas bandas deben ser muy visibles puesto que de lo contrario no se consiguen buenos perfiles de LSSP-PCR. Se conoce que la banda debe extraerse de la manera más estéril posible de un gel de agarosa de bajo punto de fusión o de una baja concentración (0.8%). Es importante recuperar estrictamente la banda de interés, por lo que se aconseja utilizar pipeta pasteur y evitar cortar la banda con bisturí. La banda se diluye en 10 partes de agua y se calienta, agitando constantemente para fundir la agarosa. El DNA se extrae del fondo del tubo (Pena, 2004; Barreto, 2004). Estos eluatos se prepararon inmediatamente

antes de la reacción de LSSP-PCR. Para la reacción de amplificación se utilizaron 1, 2 y 3 μ L de la banda purificada. Se consiguieron perfiles de LSSP-PCR con buena intensidad usando 2 μ L de las mismas.

Cuando se evaluó la concentración del oligonucleótido a utilizar se probaron concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 μ M. La concentración óptima para conseguir perfiles de LSSP-PCR fue de 5.0 μ M, independientemente del oligonucleótido usado. La concentración de Taq también influye considerablemente en la reacción. Se probaron 2.0, 4.0 y 8.0 U y se encontró que con esta última se obtuvieron perfiles claros y reproducibles.

La temperatura de alineamiento que genera las condiciones de baja astringencia ha sido de 30°C (Pena *et al.*, 1994; Assunção Oliveira *et al.*, 2003). También se evaluaron temperaturas de 35 y 40°C. Los resultados obtenidos con las temperaturas de 30 y 35°C fueron muy pobres y en la mayoría de casos no se obtuvieron amplificaciones o estas fueron muy tenues. Caso contrario se observó cuando se realizaron las amplificaciones a 40°C puesto que se obtuvieron perfiles claros y reproducibles. De todos los experimentos que se llevaron a cabo solamente el número 3 presentó perfiles de LSSP-PCR de muy baja intensidad, que mejoraron ostensiblemente cuando se aumentó la cantidad de DNA obtenido de la purificación de la banda. Adicionalmente se trató de trabajar con temperaturas más bajas pero sin éxito. Con temperaturas más altas tampoco se generaban perfiles adecuados, presentándose únicamente 1 o 2 bandas.

LSSP-PCR es sensible a algunas variables como el uso de baja temperatura de alineamiento, altas concentraciones de Taq polimerasa y de oligonucleótido (Pena *et al.*, 1994). El mecanismo exacto que se desarrolla en una reacción de LSSP-PCR no está completamente dilucidado. Se cree que la producción de múltiples fragmentos está relacionada con la especificidad del alineamiento del oligonucleótido a su extremo complementario y con menos especificidad a varios sitios en el resto de la secuencia. Esto es posible gracias al uso

de altas concentraciones de un único iniciador y de Taq polimerasa en una baja temperatura de alineamiento. La extensión que genera la Taq polimerasa a partir del complejo iniciador-DNA molde produce un patrón de fragmentos de tamaño variable debido a la reacción dinámica del oligonucleótido y sus sitios de alineamiento (específicos o no), así que los productos generados en el comienzo de la reacción actúan como conductores. Cuando estos productos se analizan en geles de poliacrilamida (con tinción de plata) se puede revelar un perfil de multibandeo que refleja las variaciones presentes en la secuencia de DNA problema (Pena *et al.*, 1994; Barreto *et al.*, 1996). La reproducibilidad y estabilidad de las señales genéticas producidas por LSSP-PCR se verificaron repitiendo los perfiles en varias ocasiones y siempre se obtuvo idéntico resultado (Figura 2).

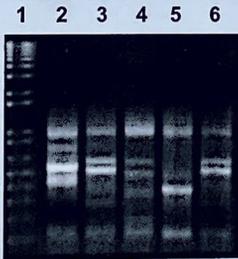


Figura 2. Perfiles de LSSP-PCR en *Bt*. 1. Marcador de peso de 1 kb; 2. Oligonucleótido Aa1; 3. Oligonucleótido Aa2; 4. Oligonucleótido Ab1; 5. Oligonucleótido Ac1; 6. Oligonucleótido Ac2.

Otras técnicas de PCR como AFLP-PCR, LS-PCR, AP-PCR (RAPD), RFLP-PCR ofrecen información similar a la que genera LSSP-PCR, pero tienen el inconveniente de la necesidad de extraer grandes cantidades de DNA purificado. Con respecto a esto LSSP-PCR es una técnica valiosa si se tiene en cuenta que se puede aplicar tan pronto como se ha conseguido la amplificación de un fragmento por PCR (Assunção Oliveira *et al.*, 2003).

Se ha observado que cambios en aminoácidos esenciales en las proteínas Cry generan un cambio conformacional que influye directamente en el espectro y nivel de actividad biológica. LSSP-PCR es una técnica promisoría cuando se trata de identificar variantes de genes insecticidas de *Bt*, los cuales pueden ser utilizados para la producción de nuevos y más efectivos bioinsecticidas.

GLOSARIO

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por su sigla en Inglés). Técnica que permite obtener muchas copias idénticas de un fragmento de ADN.

Oligonucleótido: Fragmento corto de ADN que se utiliza para iniciar la síntesis de un fragmento de ADN durante la PCR. Generalmente presentan tamaños que oscilan entre 10 y 25 nucleótidos.

Patrón de Bando: Conjunto de fragmentos de ADN que se obtiene tras aplicar las técnicas de amplificación por PCR aleatorias al estudio de un gen. Cada gen presenta un grupo de segmentos de ADN característico que permite diferenciarlo de otros.

Taq Polimerasa: Enzima empleada en el proceso de amplificación por PCR. Su función es catalizar la unión de los nucleótidos (elementos constituyentes del ADN) que se encuentran libres en la reacción.

Temperatura de anillaje: Temperatura a la cual un oligonucleótido se une de manera altamente específica a un segmento de ADN en función de la complementariedad existente entre la secuencia nucleotídica de estos dos.

BIBLIOGRAFÍA

- Assunção Oliveira, M. A., O. L. Caballero, A. R. Vago, R. A. Harskeerl, A. J. Romanha, S. D. J. Pena, A. J. G. Simpson and M. Cota Koury. 2003. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 127-135.
- Barreto, G. 2004. Puntos críticos para conseguir buenos perfiles de LSSP-PCR. Universidad del Valle-Colombia. Comunicación personal.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalich, Y. 1997. Extended screening by PCR for seven *cry* group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4883-4890.
- Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola, and M. G. Kozicel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3057-3061.
- Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca, and A. Bravo. 1995. Specific PCR Primers Directed To Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3826-3831
- Chestukhina, G.C., Kostina, L.I., Mikhilova, S.A., Tyurin, F., Klepikova, S. and Stepanov, M. 1994. Production of multiple N-endotoxins by *Bacillus thuringiensis*: N-endotoxins produced by strains of the subspecies *galleriae* and *wuhanensis*. *Can. J. Microbiol.* 40: 1026-1034.
- Cobb, D. and J.M. Clarkson. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*. 22: 3801-3805.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Juárez-Pérez, V. M., Ferrandis, M. D. and Frutos, R. 1997. PCR based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002.
- Kalman, S., Kiehne, K.L., Libs, J.L. and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
- Kuo, W.S. and Chak, K.F. 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1367-1377.
- Pena, S.D.J. 2004. Condiciones clave para lograr buenos perfiles de LSSP-PCR. Departamento de Bioquímica e Imunología, Universidade Federal de Minas Gerais. Comunicación personal.
- Pena SDJ, Simpson AJG. 1996. Sequence-specific gene signatures produced by LSSP-PCR. In: Landegren U, editor. *Laboratory Protocols for Mutation Detection*. Oxford: Oxford University Press: 42-47.
- Porcar, M., V. Juárez-Pérez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes FEMS Microbiology Reviews. 26: 419-432.
- Ranasinghe, C. and R. Akhurst. 2002. Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detecting novel *Bt* toxins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 79: 51-58.