

# ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE GENES DE LA FAMILIA *cryI* de *Bacillus thuringiensis* ACTIVOS CONTRA INSECTOS LEPIDOPTEROS.

Paba C<sup>1</sup>, Vence V<sup>1</sup>, Hernández J<sup>2</sup> y Bernal J<sup>3</sup>

1. Tesistas Centro de Biología Molecular del Gimnasio Campestre CEBM. Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana;

2. Coordinador CEBM; 3. Director CEBM.

Autor para correspondencia : [centrobiomol@campestre.edu.co](mailto:centrobiomol@campestre.edu.co)

## Resumen

Se estandarizaron las condiciones para amplificar por PCR genes de la familia *cryI* de *Bacillus thuringiensis* activos contra insectos lepidópteros en utilizando oligonucleótidos generales. Se evaluó el efecto de la concentración de MgCl<sub>2</sub>, temperatura de anillaje, concentración de DNA y tipo de extracción de DNA, obteniéndose un producto de amplificación esperado de 543-598 pb utilizando concentraciones de 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 ng de DNA aproximadamente y una temperatura de anillaje de 55°C. No se observó ninguna diferencia entre los resultados obtenidos utilizando extractos crudos y DNA extraído por el método de M. He (1990).

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, PCR, oligonucleótidos, estandarización

## Summary

Conditions to amplify *cryI* genes active against Lepidoptera insects by PCR in *Bacillus thuringiensis* using general primers, were standardized. Effects of MgCl<sub>2</sub> and DNA concentration, annealing temperature and DNA extraction method were assessed, obtaining an amplified product of 543-598 pb using 2mM de MgCl<sub>2</sub>, approximately 10 ng of DNA. And annealing temperature of 55°C. No significant differences were found between results obtained using two DNA extraction methods.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, PCR, primers, standardization

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram positiva, esporulada, cosmopolita y entomopatógena que se caracteriza por sintetizar cristales proteicos con actividad insecticida (ICP's, del inglés Insecticidal Cristal Proteins), también denominadas  $\alpha$ -endotoxinas, las cuales son codificadas por los genes *cry*. Se han descrito más de 150 cepas de *Bt* cuya actividad biocida es específica contra insectos lepidópteros (Hofte & Whiteley, 1989), coleópteros (Krieg *et al.* 1983) y dípteros (Golberg & Margalit, 1977). Sin embargo, recientemente se han identificado toxinas que controlan ácaros y algunos nemátodos y platelmintos (Feitelson *et al.* 1992).

De igual forma, han sido descritas 41 familias de proteínas Cry, las cuales se caracterizan por la alta especificidad biológica sobre los organismos fitopatógenos que controlan, confiéndole a éste microorganismo una importancia única frente al control de plagas.

La familia de genes *cryI* es reconocida por codificar proteínas insecticidas activas contra insectos lepidópteros, siendo la familia que agrupa el mayor número de genes descritos con un total de 121; la diferencia en secuencias de nucleótidos dentro de una misma familia es relativamente baja (Crickmore, 2003), y por lo tanto, el uso de

oligonucleótidos generales, es decir, oligonucleótidos que tienen secuencias homólogas a una región específica común a todos los genes pertenecientes a un mismo grupo, se hace ventajoso para identificar genes *cryI* ya que hace posible que en una reacción sean reconocidos muchos genes, los cuales, posteriormente pueden ser identificados con oligonucleótidos específicos para cada subgrupo o gen individual. En éste estudio, se estandarizó la amplificación de genes *cryI* utilizando un oligonucleótido general *cryI* diseñado para reconocer secuencias homólogas en todos los subgrupos de genes de esta familia que se han identificado hasta el momento y que comprenden desde el subgrupo *cryIA* hasta el subgrupo *cryIK* (Bravo *et al.* 1998).

## Metodología

Para estandarizar la amplificación por PCR de genes de la familia *cryI*, se utilizaron los oligonucleótidos generales (5' C T G G A T T T A C A G G T G G G G A T A T (d) ; 5'TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT (r) descritos por Bravo *et al.* (1998). El tamaño en pares de bases del producto de amplificación esperado varía entre 543 y 594 pb. Las condiciones de amplificación se estandarizaron teniendo en cuenta cinco factores: concentración de MgCl<sub>2</sub>, temperatura de anillaje, concentración de DNA, número de ciclos y tipo de extracción de DNA.



Ensayo	Mezcla	Programa		
		Denaturación inicial	Ciclos de Amplificación	Elongación Final
1	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 1.5 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos 1 $\mu$ M Taq. 2.5 U, DNA (100-300 ng/ $\mu$ l) 20 y 60 ng aprox.	95°C 2 min	Denaturación 95°C 1min Anillaje 49°C 1 min Elongación 72°C 1 min 30 ciclos	72°C 2 min
2	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 2.0 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos 1 $\mu$ M Taq. 2.5 U, DNA (100-300 ng/ $\mu$ l) 10 y 60 aprox.	95°C 2 min	Denaturación 95°C 1min Anillaje 50°C 1 min Elongación 72°C 1 min 30 ciclos	72°C 2 min
3	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 2.0 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos 1 $\mu$ M Taq. 2.5 U, DNA (100-300ng/ $\mu$ l) 20, 60 y 100ng aprox.	95°C 2 min	Denaturación 95°C 1min Anillaje 52°C 1 min Elongación 72°C 1 min 30 ciclos	72°C 2 min
4	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 2.0 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos(2/10) 1 $\mu$ l, Taq. 2.5 U, DNA (100-300 ng/ $\mu$ l) 20, 50 y 60 ng aprox y 15 $\mu$ l extracto crudo.	95°C 2 min	Denaturación 95°C 1min Anillaje 52°C 1 min Elongación 72°C 1 min 30 ciclos	72°C 2 min
5	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 2.0 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos 1 $\mu$ M Taq. 2.5 U, DNA(100-300 ng) 10 20 50 Y 100 ng aprox y 15 $\mu$ l extracto crudo.	94°C 4 min	Denaturación 94°C 45 seg Anillaje 54°C 45 seg Elongación 72°C 1 min 34 ciclos	72°C 6 min
6	DNTPs 200 $\mu$ M, Mg <sup>+2</sup> 2.0 mM, Buffer 1X, Oligonucleótidos 1 $\mu$ M Taq. 2.5 U, DNA(100-300 ng) 10 ng aprox y 15 $\mu$ l extracto crudo.	94°C 4 min	Denaturación 94°C 45 seg Anillaje 55°C 45 seg Elongación 72°C 1 min 34 ciclos	72°C 6 min

**TABLA 1.** Ensayos utilizados para la estandarización de la amplificación de genes *cry1*. El DNA utilizado en los ensayos fue extraído utilizando la metodología de M. He 1990 (Fenol - Cloroformo - Alcohol isoamílico), los extractos crudos se obtuvieron por el método de Carozzi *et al.* (1991).

## Resultados y Discusión

En un primer ensayo realizado con el programa descrito por Bravo *et al.* (1998) utilizando las concentraciones generalmente recomendadas (200  $\mu$ M DNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer 1X, 1  $\mu$ M Oligonucleótidos, 2.5 U Taq polimerasa) no se obtuvieron productos de amplificación.

El aumento de la concentración del MgCl<sub>2</sub> a 2.0 mM no cambió el resultado de la reacción. Las variaciones de las temperaturas de anillaje de 49°C a 50°C y 52°C realizadas en los ensayos 2, 3 y 4 no mostraron ningún producto de amplificación; por el contrario, en el ensayo 5 (Figura 1), en el cual se mantuvo la concentración de MgCl<sub>2</sub> en 2.0 mM, se aumentó la temperatura de anillaje de 52°C a 54°C y el número de ciclos se cambió de 30 a 34, obteniéndose un producto de 543-598 pb y una banda inespecífica de menos de 450 pb como se observa en la Figura 1.

Estos resultados muestran que el factor determinante para lograr la amplificación con las condiciones utilizadas fue la temperatura de anillaje.

La presencia de una banda inespecífica (450 pb) puede ser el resultado de una temperatura de anillaje baja, ya que se sabe que a mayor temperatura aumenta la astringencia en la hibridación y, por lo tanto la especificidad de la unión de los oligonucleótidos (Ausubel *et al.* 1984; Gibbs *et al.* 1992), corroborándose al realizar el ensayo 6, donde la temperatura de anillaje fue de 55°C. En éste último, se obtuvo en cada reacción una banda única y específica del peso esperado (543-598 pb) como se observa en la Figura 2.

La amplificación se presentó de forma más efectiva usando menores cantidades de DNA. En estudios previos donde se cuantificó y determinó el efecto de las concentraciones del DNA para amplificar varios grupos de genes *cry* (Hernández, 1997), la amplificación fue más eficiente con bajas concentraciones de DNA y a concentraciones mayores llegó a inhibirse la amplificación. El producto de amplificación obtenido utilizando 0.5  $\mu$ l de DNA extraído por el método de M. He (1990) (10-100 ng/ml) en comparación con los obtenidos a partir de extractos crudos no presenta ninguna diferencia significativa en cuanto a la cantidad del producto de amplificación.

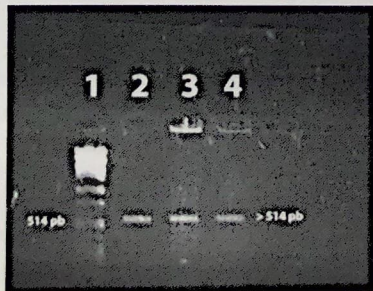


El producto de amplificación obtenido utilizando aproximadamente 10 ng de DNA, extraído por el método, de M. He (1990) en comparación con los obtenidos a partir de extractos crudos no presenta ninguna diferencia significativa en cuanto a la cantidad del producto de amplificación. Sin embargo, aunque es evidente la presencia de un leve barrido en el corrido electroforético del producto obtenido a partir de extractos crudos. Las condiciones para la amplificación de genes *cryI* de las cepas aisladas a partir de los suelos colectados consistieron en una denaturación inicial a 94°C durante 4 minutos, 34 ciclos de amplificación (denaturación a 94°C por 45 seg., anillaje a 55°C por 45 seg., elongación a 72°C por 1 min.) y una elongación final a 72°C por 6 minutos. Las concentraciones de la mezcla de reacción fueron: 200 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer PCR 1X (100 mM Tris-HCl pH 9.0 a 25°C, 500 mM KCl, 1.0% Triton X100), 1 μM Oligonucleótidos y 2.5 U Taq-polimerasa. El DNA utilizado como molde fue obtenido por el método descrito por M. He. (1990), del cual se utilizaron 0.5 μl para la reacción.

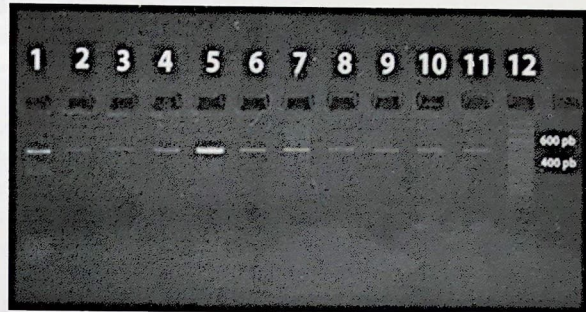
La caracterización molecular por PCR utilizando el oligonucleótido general-*cryI* permitió identificar 18 cepas que fueron positivas para la presencia de genes *cryI*, las cuales representan un 12.58% de las 143 cepas nativas colombianas caracterizadas.



**Figura 1.** Efectos de la concentración del DNA plasmídico y la temperatura de anillaje (54°C) en la amplificación por PCR de los genes *cryI* en el ensayo 5. Carril 1. Marcador de Peso molecular ( $\lambda$  digerido con *pstI*), carril 2. 20 ng de DNA aprox. carril 3. 50 ng de DNA aprox, carril 4. 100 ng de DNA aprox. carril 5. 10 ng de DNA aprox y carril 6. 15 μml extracto crudo. En los carriles 1 al 6, se observa una banda específica de más de 514 pb y en los carriles 5 y 6 una inespecífica de aproximadamente 450 pb por debajo de la banda de 480 pb del marcador.



**Figura 2.** Efectos de la concentración del DNA plasmídico y la temperatura de anillaje (55°C) en la amplificación por PCR de los genes *cryI* en el Ensayo. Carril 1. Marcador de peso ( $\lambda$  digerido con *pstI*), Carril 2. 10 ng de DNA aprox, Carriles 3 y 4. 15 μl de extracto crudo. Se observa en cada carril una banda única por encima de las 514 pb correspondiente al producto de amplificación esperado.



**Figura 3.** Productos de Amplificación de aislamientos nativos. Carril 1. *Kurstaki* HD1, carril 2. 115BtGC, carril 3. 121BtGC, carril 4. 94BtGC, carril 5. 93BtGC, carril 6. 96BtGC, carril 7. 53BtGC, carril 8. 89BtGC, carril 9. 77BtGC, carril 10. 70BtGC, carril 11. *Kurstaki* HD1 y carril 12. Marcador Low DNA Mass Ladder.

### Bibliografía

- Ausubel, F., Roger, B., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. Ed. Board. Volume 2, Supplement 46.
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F., Peña, G., Núñez-Valdez, M., Soberón, M. & Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *App. Environm. Microb.* 64 (12): 4965-4972.
- Crickmore Neil, lista de proteínas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis*, School of Biological Sciences, University of Sussex, Brighton, (<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/>) [2003].
- Carozzi, N. B. 1993. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *App. Envir. Microb.* 3057-3061.
- Feitelson, J.S., Payane, L., Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*. *Insects and Beyond Technology.* 10: 271-275.
- Gibbs, R. Chamberlain, J. and Caskey, T. 1992. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Diagnosis of New Mutations Diseases Using the Polymerase Chain Reaction. Oxford University Press USA.
- Goldberg, L. J. & Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mos. News.* 37: 355-358.
- Hernandez, J. 1997. Caracterización Microscópica, Bioquímica y Molecular de Aislamientos Nativos de *Bacillus thuringiensis* en Colombia. Trabajo de Grado (Maestría en Biología). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Höfte, H. & Whiteley H.R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews.* 53: 242-255.
- Krieg, A., Huger, M., Langenbruch, G., Schenetter, N., 1983. *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*. *Journal of Applied Entomology.* 96: 500-508.