



# Universidad del Mar

## Campus Puerto Escondido

---

---

**“Clonación y expresión del gen *cry57Aa1* a partir de una  
cepa atípica de *Bacillus thuringiensis*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**OSCAR JESUS ORTIZ ARRAZOLA**

**DIRECTOR:**

**DR. JORGE E. IBARRA RENDÓN**

**PUERTO ESCONDIDO, OAXACA, OCTUBRE DEL 2011**



# UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido - Puerto Ángel - Huatulco

OAXACA

Puerto Escondido, Oaxaca, a 14 de septiembre del 2011

ASUNTO: Votos aprobatorios

**Dr. José Luis Villarruel Ordaz**  
Jefe de la carrera de Biología  
Universidad del Mar, campus Puerto Escondido

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **"Clonación y expresión del gen cry57Aa1 a partir de una cepa atípica de *Bacillus thuringiensis*"**, realizado por el pasante de Biología **Oscar Jesús Ortiz Arrazola** con número de matrícula **05080011**, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Dr. Jorge E. Ibarra Rendón

Dra. Ma. Cristina Del Rincón Castro

M. en M. Mónica Marcela Galicia Jiménez

Dra. Juana Laura Rivera Nava

M. en C. Karina Julieta Cruz Vázquez

c.c.p. M. en C. Gerardo E. Leyte Morales. Vice-rector Académico. Universidad del Mar  
c.c.p. Ing. Ruth Cruz Ríos. Jefa del Departamento de Servicios Escolares. Universidad del Mar

UNIVERSIDAD DEL MAR  
Puerto Escondido - Puerto Ángel - Huatulco  
OAXACA  
Ciudad Universitaria, Puerto Escondido, Oax.  
01 (958) 58 33365  
**RECIBIDO**  
23 SEP 2011  
VICE-RECTORIA ACADÉMICA  
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oax.  
01 (958) 58 43057 v Fax 01 (958) 58 43078

Ciudad Universitaria, Huatulco, Oax.  
01 (958) 58 72559. 72580 v 72561

UNIVERSIDAD DE  
Puerto Escondido, Puerto Ángel,  
Huatulco  
OAXACA  
23 SEP 2011  
VICE-RECTORIA ACADÉMICA  
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE  
BIOINSECTICIDAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV) UNIDAD IRAPUATO  
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE E. IBARRA RENDÓN.**

**A mi madre**

Por ser la persona más maravillosa del mundo, por tu gran amor y esfuerzo.

**A mi padre**

Por ser un ejemplo maravilloso y que siempre he admirado.

**A mis hermanas Gladys y Dulce**

Por todo su cariño y apoyo; las quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Jorge E. Ibarra Rendón** por su apoyo y asesoramiento en la dirección de la presente tesis.

A la **M. C. Regina Basurto Ríos**, por su constante aliento y asesoría en el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. María Cristina Del Rincón**, por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

**Ing. Javier Luévano Borroel y Katy**, por su enseñanza y colaboración prestada.

A los profesores **Dr. Arturo Reyes Ramírez y la M.C. Beatriz Rodas junco** por su gran apoyo para poder estar en el laboratorio de Bioinsecticidas.

**M.M. Mónica Marcela Galicia, Dra. Juana Laura Rivera y M.C. Julieta Karina Cruz**, por las sugerencias y correcciones finales realizadas para el logro de la presente tesis.

A **Jennifer**, por toda su comprensión, apoyo y cariño, muchas gracias no tengo como agradecerlo.

A los compañeros de generación y compañeros de grupo por su amistad y apoyo brindado durante estos 5 años de la carrera: **Epifanio, Saira Esmeralda, Dora, Addy, Valeria, Pako, Lucy, Adolfo, Filo, y Carlos.**

A los compañeros y amigos del laboratorio de Bioinsecticidas, **Magy, Dulce, Juan, Vero, Cris, Ale y Gerardo.**

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue clonar al gen *cry57Aa1* a partir de la cepa LBIT-979 de la serovariedad *kim* de *B. thuringiensis*, y corroborar su expresión en forma de cristales parasporales. En la primera fase del trabajo se diseñaron los oligonucleótidos Cry57D (directo) y Cry57R (reverso) con el software AnnHyb Versión 4.942, colocando en los extremos las enzimas de restricción Sall y PstI; con el cual se amplificó el fragmento de 1830 pb del gen *cry57Aa1*. En la segunda parte se realizó una subclonación del fragmento del gen *cry57Aa1* en el vector para productos de PCR pCR TOPO 2.1, para ser digeridos con las enzimas de restricción Sall y PstI. Para la segunda fase el fragmento digerido se clonó en el vector de expresión pSTAB. En el cuarto paso se realizó la transformación de las cepas acristalíferas proveniente de *B. thuringiensis serovariedad kurstak* (Cry-B) y *B. thuringiensis serovariedad israelensis* (4Q7) con el vector de expresión pSTAB y el fragmento del gen *cry57Aa1*.

Los resultados obtenidos fueron: se logró expresión del fragmento del gen *cry57Aa1* en la cepa acristalífera *B. thuringiensis serovariedad israelensis* (4Q7), obteniendo esporas de forma alargada de 1  $\mu\text{m}$  y cristales que tienen forma de esferas pequeñas. La verificación de la expresión del gen *cry57Aa1* se realizó con la extracción de plásmidos por lisis alcalina de la cepa acristalífera, en la cual se obtuvo una banda de la construcción pSTAB/Cry57Aa1 de 9,254 pb, a esta construcción se realizó PCR para amplificar el fragmento *cry57Aa1* de 1,830 pb.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	I
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	2
2.2. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	4
2.3. Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> como bioinsecticida.....	5
2.4. Ciclo de vida y cuerpo paraesporal de <i>B. thuringiensis</i> .....	7
2.5. Proteínas bioinsecticidas.....	9
2.5.1. Proteínas Cry.....	9
2.5.2. Proteínas Cyt.....	11
2.5.3. $\beta$ -exotoxina.....	11
2.5.4. Proteínas insecticidas vegetativas (VIP).....	11
2.6. Modo de acción de las proteínas Cry.....	12
2.7. Cepas novedosas de <i>Bacillus thuringiensis</i> a través de técnicas genéticas.....	14
2.7.1. Conjugación.....	14
2.7.2. Electroporación.....	15
2.7.3. Transducción.....	15
2.7.4. Mutación clásica.....	15
2.7.5. Tecnología del DNA recombinante.....	16
2.8. Caracterización toxicológica y patotipos.....	18
2.9. Identificación de nuevos genes <i>cry</i> por técnicas de PCR.....	19

2.10. Genética de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
2.10.1. Plásmidos.....	20
2.11. Estructura de los genes <i>cry</i> .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivo específico.....	24
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
6.1. Material biológico.....	25
6.2. Diseño de secuencias del iniciador del holotipo <i>cry57Aa1</i> .....	26
6.3. Extracción de DNA plasmídico de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
6.4. Amplificación de los nuevos holotipos por PCR.....	27
6.5. Clonación de amplicones en el vector pCR2.1 TOPO de Invitrogen.....	27
6.6. Transformación de <i>E. coli</i> TOPO-10 por choque térmico.....	28
6.7. Amplificación y extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> por lisis alcalina....	28
6.8. Clonación de amplicones en el vector pSTAB.....	28
6.9. Transformación de <i>E. coli</i> TOPO-10 por choque térmico.....	29
6.10. Transformación de cepas acristalíferas de <i>B. thuringiensis</i> en CryB y 4Q7.....	29
6.11. Obtención del complejo spora-cristal.....	30
6.12. Observación al microscopio de los cristales recombinantes.....	30
6.13. Corroboración de la presencia del gen clonado en la cepa recombinante por extracción de DNA plasmídico (cepa acristalífera Cry-B).....	30
6.14. Corroboración por PCR de la presencia del gen clonado en la cepa recombinante.....	31
<b>7. Resultados</b> .....	32
7.1. Aislamiento de plásmidos de LBIT-979 y amplificación del gen <i>cry57Aa1</i> .....	32
7.2. Clonación del amplicón <i>cry57Aa1</i> en el vector pCR2.1 TOPO.....	33



7.3. Clonación del inserto <i>cry57Aa1</i> en el vector pSTAB para su expresión.....	34
7.4. Transformación y expresión de la construcción pSTAB/ <i>cry57Aa1</i> en la cepa acristalífera Cry-B.....	35
7.5. Verificación de la expresión del gen <i>cry57Aa1</i> por extracción de plásmido y PCR.....	36
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>9. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>
<b>12. APÉNDICE.....</b>	<b>51</b>
A. Fragmento del gen <i>Cry57Aa1</i> de <i>Bacillus thuringiensis serovariedad kim</i> ....	51
B. Mapa físico del vector pCR Topo 2.1 .....	52
C. Mapa físico del vector pSTAB .....	53
D. Medios de cultivo y soluciones.....	54

## ÍNDICE DE FIGURA

	Página
<b>Figura 1.</b> Micrografía de <i>B. thuringiensis</i> , en estado de esporulación.....	3
<b>Figura 2.</b> Diagrama del ciclo de vida de <i>B. thuringiensis</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Filograma de la identidad entre las secuencias de las proteínas Cry.....	10
<b>Figura 4.</b> Modo de acción de la proteína Cry.....	13
<b>Figura 5.</b> Construcción genética de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema lineal de las protoxinas y posición de los bloques de aminoácidos conservados .....	22
<b>Figura 7.</b> Aislamiento de plásmido de LBIT 979/silvestre y amplificación del fragmento del gen <i>cry57Aa1</i> .....	32
<b>Figura 8.</b> Clonación del gen <i>cry57Aa1</i> en el vector pCR2.1 TOPO.....	33
<b>Figura 9.</b> Clonación del gen <i>cry57Aa1</i> en el vector de expresión pSTAB.....	34
<b>Figura 10.</b> Morfología de la cepa recombinante pSTAB/ <i>cry57Aa1</i> .....	35
<b>Figura 11.</b> Extracción de plásmido pSTAB/ <i>cry57Aa1</i> y PCR de gen <i>cry57Aa1</i> .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las proteínas insecticidas de <i>B. thuringiensis</i> .....	18
<b>Tabla 2.</b> Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	25
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de iniciadores.....	26