

Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra endotoxinas con actividad bioinsecticida CRY I, CRY III y CRY IV, asociadas al cristal de tres cepas patrón de *Bacillus thuringiensis*

MA. TERESA REGUERO
 JAIRO CERÓN
 DANIEL URIBE
 CLAUDIA S. MORA
 LUZ DARY AMAYA

RESUMEN

El *Bacillus thuringiensis* (B.t.) es una bacteria Gram (+) altamente cosmopolita, que se caracteriza por producir durante la esporulación, inclusiones cristalinas (d-endotoxinas) con actividad insecticida contra insectos plaga (lepidópteros, dípteros y coleópteros).

En este trabajo, se presenta la obtención, purificación y valoración inmunoquímica de anticuerpos policlonales contra tres-endotoxinas, Cry I, Cry II y Cry IV.

Los resultados mostraron que los anticuerpos presentaron reactividad con -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Mediante un análisis de especificidad de Western Blot, se determinó el péptido de la proteína contra el cual estaba dirigido el anticuerpo. Las condiciones de trabajo permitieron determinar parámetros experimentales como las concentraciones de antígeno a usar para predecir, de forma preliminar, la actividad bioinsecticida de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* en estudio, bajo las diluciones preestablecidas de los sueros obtenidos, utilizándose éstos como reactivos de diagnóstico, permitiendo al investigador proyectar los posteriores ensayos corroborativos de dicha actividad.

SUMMARY

Bacillus thuringiensis (B.t.) belongs to microorganism Gram (+) with insecticidal activity. In the sporulation stage these bacillus generated a crystalline inclusion (-endotoxine) with insecticide activity against plague insect such as lepidopters, dipters and coleopters.

In the present work, obtention, purification and immunochemical evaluation of polyclonal antibodies against three -endotoxins (Cry I, Cry II y Cry IV.) was made.

The results of these investigations point out that antibodies had reactivity against d-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. The peptide of the protein in front of the polyclonal antibodies was determined by specificity analysis (Western Blot). The following parameters antigen concentration and dilution of the serum was determined to foretell the preliminar bioinsecticidal activity of a wild strain of *Bacillus thuringiensis*. These pattern of assays allow to establish the further experiments for the evaluation of bioinsecticidal activity.

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas a los que se ven expuestos los cultivos de plantas, lo constituye la presencia y ataque de plagas de origen entomológico, quienes representan el 15% o más del costo total de montaje y mantenimiento de un determinado cultivo, causando perjuicio tanto a productores como a consumidores (1)

Dentro de los agentes que contribuyen al control de dichas plagas se encuentran insecticidas químicos y biológicos (2). Estos últimos presentan ventajas frente a los primeros ya que debido a su biodegradabilidad se evitan contaminaciones de suelos y agua, al mismo tiempo que reduce la posibilidad de adquisición de resistencia de insectos susceptibles, por residuos en el medio ambiente. Además, por su alta especificidad hacia el insecto blanco, el producto se hace inocuo al hombre y a insectos benéficos (3,4)

Dentro de los productos bioinsecticidas, el 95% de estos lo constituyen formulaciones a base de *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria del suelo se caracteriza por producir, durante la esporulación, proteínas llamadas -endotoxinas, que poseen actividad bioinsecticida contra diferentes grupos de insectos (lepidópteros, coleópteros y dípteros) según el tipo de gen "Cry" que las codifique, basados en la clasificación de Höfte & Whitley (5).

* Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 29743, Santafé de Bogotá. Colombia

Con la consecución de cepas de *Bacillus thuringiensis* nacionales, se hace necesaria una caracterización que permita hacer un diagnóstico del espectro de actividad bioinsecticida que posea la endotoxina de cada cepa de *Bacillus thuringiensis* en particular. Dentro de las técnicas de laboratorio utilizadas para este fin, se encuentran fundamentalmente ensayos de biología molecular, como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y a nivel de campo los bioensayos.

Aunque los resultados de estos ensayos son determinantes, el desconocimiento de la actividad de una cepa nativa sugiere la realización de múltiples pruebas, lo que implica un aumento considerable de costos y de tiempo. Por lo tanto, la utilización de una herramienta preliminar que permita predecir una u otra actividad bioinsecticida, le permitirá al investigador orientar sus posteriores ensayos corroborativos de una manera más acertada.

La presente investigación tiene como propósito contribuir a la caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* mediante el uso de anticuerpos policlonales obtenidos de proteínas específicas de *Bacillus thuringiensis*, que actúan contra un orden de insectos determinado (lepidópteros, coleópteros y dípteros) (6,7)

PARTE EXPERIMENTAL

Selección de cepas patrón. Con base en la clasificación de Höfte & Whitley, se seleccionaron tres cepas de *Bacillus thuringiensis*:

- 1) Cepa HD25, con tipo de gen Cry I que codifica para una endotoxina de 134 Kda con actividad contra lepidópteros.
- 2) Cepa BST1, con tipo de gen Cry III que codifica para una endotoxina de 73.1 Kda que es activa contra coleópteros.
- 3) Cepa H-14, con tipo de gen Cry IV que codifica para una endotoxina de 72.4 Kda activa contra dípteros.

Obtención de endotoxina (antígenos). La fermentación de las cepas seleccionadas se llevó a cabo en 500 mL de medio HCO según Abarca et al (8), con la siguiente composición por litro: KH_2PO_4 , 6.8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.12 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.014 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0016 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.028 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.11 g; bacto triptona, 7.0 g; glucosa, 3.0 g; ajustando el pH a 7.2 con KOH 3N y esterilizando a 121° por 15 minutos.

Alcanzando el tiempo de esporulación y liberación de cristales, visualizados microscópicamente, se centrifugaron los cultivos fermentados a 4500 g por 15 minutos a 4°C y se separaron los cristales de las esporas por gradientes

discontínuos de densidad usando colchones de 87%, 67% y 45% de sacarosa (6). Una vez extraída la banda de la interfase 87% -67% que contiene los cristales protéicos, las muestras se liofilizaron y cuantificaron por el método de Lowry (9). Efectuando electroforesis en geles de poliácridamida (7.5%T - 4%T) y SDS, se realizó un análisis densitométrico colocando 10 µg de proteína por pozo (10, 11). Para obtener los péptidos en las concentraciones antigénicas de inoculación, se corrieron geles preparativos de poliácridamida y SDS.

Obtención de anticuerpos. Como reactivos biológicos se usaron conejos blancos machos, variedad Nueva Zelanda. Se realizaron inicialmente 4 inoculaciones a intervalos de 8 días entre si, con 100 µg de antígeno cada vez, emulsionado en un sistema adyuvante incompleto de Freudén (2a y 4a inoculación), con buffer Tris-HCl, pH 7.2 por vía subcutánea (6).

Para detectar y evaluar el título de anticuerpos específicos se realizaron inmunodetecciones por Dot Blot, colocando 2 µg de antígeno por pozo, solubilizando con Na_2CO_3 , 50 mM; DTT, 10 mM y pH 12, sobre papel de nitrocelulosa (13). Se evaluaron soluciones de los sueros desde 1/100 hasta 1/8000 frente a suero preinmune usado como control negativo a las mismas diluciones (12)

Se realizaron otras dos nuevas inoculaciones, con igual concentración de antígeno y vía de administración, aboliendo el uso de adyuvantes. Por los resultados obtenidos en inmunodetección se efectuaron dos nuevas inoculaciones, incrementando a 500 µg la dosis de antígeno a inocular y usando en la última inyección la vía intraperitoneal para la administración del antígeno.

Una vez alcanzados los títulos adecuados de trabajo de los anticuerpos, se concentraron las inmunoglobulinas de los sueros por precipitación con sulfato de amonio hasta 50% de saturación de la sal en el suero.

Se centrifugaron los sueros a 3000 g por 30 minutos a 4°C y los pellets obtenidos se dializaron contra PBS pH 6.3 durante 3 días, con tres cambios de buffer (10). Finalmente se realizó una inmunodetección para evaluar el título final del suero.

Análisis de especificidad. Para evaluar la especificidad de los sueros se utilizaron las proteínas de las siguientes cepas:

- 1) Proteínas Cry I: cepas HD25, HD137 y HD1
- 2) Proteínas Cry III: cepa BST1
- 3) Proteínas Cry IV: cepas H14, HD522 y B43

En Dot Blot se analizaron 3 concentraciones de cada uno de estos antígenos, 10.0, 1.0 y 0.1 µg, con cada uno de los tres sueros, frente a controles negativos de 1.0 µg.

Para verificar el péptido contra el cual se produjeron los anticuerpos, se realizó un análisis por Western Blot para el cual se corrieron cuatro geles de poliacrilamida y SDS, utilizando concentraciones antigénicas de 10.0 µg. Uno de estos geles se empleó como control del patrón protéico de las cepas usadas (10)

RESULTADOS Y DISCUSION

Los tiempos de fermentación para alcanzar la esporulación en las tres cepas patrón de *Bacillus thuringiensis* estudiadas fueron diferentes. Así para la cepa BST1, fueron necesarias 24 horas adicionales para lograr la liberación de los cristales, en comparación con las cepas HD25 y H14, lo cual evidencia la individualidad de cada cepa de *Bacillus thuringiensis* aunque pertenezcan a la misma especie.

Durante el esquema de inmunización el análisis inmunoquímico de los sueros, después de la cuarta inoculación, mostró títulos insipientes de anticuerpos específicos contra cada -endotoxina inoculada. Esto puso al descubierto que aplicar el antígeno en la matriz de poliacrilamida, concomitantemente con el adyuvante, trae como consecuencia una no adecuada presentación del antígeno al sistema inmune. No obstante, la variación en el vehículo de entrega del antígeno solo implicó un leve incremento en el título del sueropolianticry I, llegando hasta 1/800, pero para los otros dos sueros se continuó en título de 1/100. Al incrementarse la dosis del antígeno de 100 µg a 500 µg en las inoculaciones, se obtuvieron títulos óptimos de trabajo de 1/8000 para los sueros polianticry I y polianticry IV y de 1/2000 para el suero polianticry III (Figura No. 1). Este cambio en los títulos de los sueros podría ser explicado por la baja inmunogenicidad de las -endotoxinas, ya que al incrementar la concentración del antígeno se observa un incremento en el título de los sueros resultantes. Cabe resaltar que el uso de una vía de administración como la intraperitoneal, contribuyó al incremento de los títulos, lo cual ocurrió posiblemente debido a la rápida liberación del antígeno a la linfa y evitando pérdidas del mismo ocasionadas por el paso a través de múltiples barreras.

El análisis de especificidad de los sueros frente a las proteínas analizadas por Dot Blot, permitió observar la utilidad de los sueros polianticry I y polianticry III para determinar en forma directa, la actividad bioinsecticida de -endotoxinas contra lepidópteros y coleópteros respectivamente (Figura No. 2, líneas b, d, e, f)

El suero polianticry IV reconoce a sus antígenos Cry IV, pero presenta reacción cruzada con la proteína Cry III (Figura No. 2, línea b). Por lo tanto los resultados obtenidos con este suero, deberán ser confrontados con los resultados obtenidos al utilizar el suero polianticry III, para así lograr discernir si la actividad bioinsecticida de una determinada cepa de *Bacillus*

thuringiensis es contra larvas de coleópteros o contra larvas de dípteros.

En cuanto al análisis de concentración de antígeno a utilizar en las inmunodetecciones, se observó que bajo los controles negativos usados (1µg de antígeno), el intervalo de 10.0 a 1.0 µg, fué el adecuado para determinar el carácter de positivo o negativo de una señal dada. No obstante, con concentración antigénica de 0.1 µg, se obtuvieron señales más limpias, con menor ruido de fondo y reactividades cruzadas, por lo que se consideró que esta concentración de antígeno puede ser la concentración de trabajo más adecuada, si se emplean controles negativos de la misma cantidad.

El análisis por Western Blot para determinar el péptido contra el cual estaba dirigido cada suero mostró, en línea general, que los tres sueros presentaron reacciones cruzadas con otras bandas protéicas no usadas como antígenos, lo cual es de esperarse cuando se trabaja con anticuerpos policlonales, como en este caso. Sin embargo, como puede observarse en el análisis por Dot Blot (Figuras No. 1 y No. 2), dichas reacciones cruzadas no representan un inconveniente importante en el momento de determinar la presencia de uno u otro tipo de péptido asociado al cristal. Para el suero polianticry III, se observó una interferencia con la banda de 72.4 KDa, de la cepa H14 (Figura No. 3). Estas reacciones cruzadas se pueden explicar, además de los porcentajes de homología existentes entre los tres tipos de proteína (entre el 19 y el 30%), por la característica de los anticuerpos policlonales de reaccionar sólo contra un determinante antigénico o epítipo, sino contra varios de ellos que, a la postre, pueden estar contenidos en las diferentes proteínas, pero que pueden ser más o menos inmunogénicos respecto a otros existentes en la molécula, según su composición aminoacídica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación, dejaron en evidencia que los anticuerpos policlonales obtenidos, a partir de un péptido asociado al cristal de cepas de *Bacillus thuringiensis*, pueden ser empleados como prueba de diagnóstico preliminar para predecir el insecto blanco susceptible a la actividad insecticida de los productos obtenidos de una determinada cepa de *Bacillus thuringiensis*.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a los profesores Milton Crosby, Orlando Acosta y Carlos Reverand por la asesoría prestada y al Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por el Dr. Jaime Umaña.

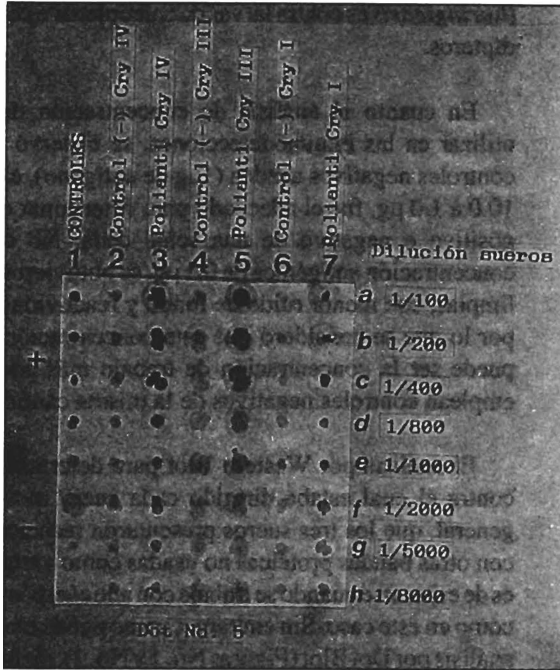


FIGURA No. 1.
Inmunodetección por Dot-Blot,
análisis de sueros precipitados
con sulfato de amonio.

Controles:
 Negativos (-) : antígenos + PBS
 Positivos (+) : suero normal de conejo +
 proteína A- fosfatasa alcalina

FIGURA No. 2.
Evaluación inmunoquímica
de los sueros contra -endotoxinas
de cepas control y patrón
de *Bacillus thuringiensis*.

Controles:
 Negativos (-) : antígenos + PBS
 Positivos (+) : suero normal de conejo
 + proteína A-fosfatasa alcalina

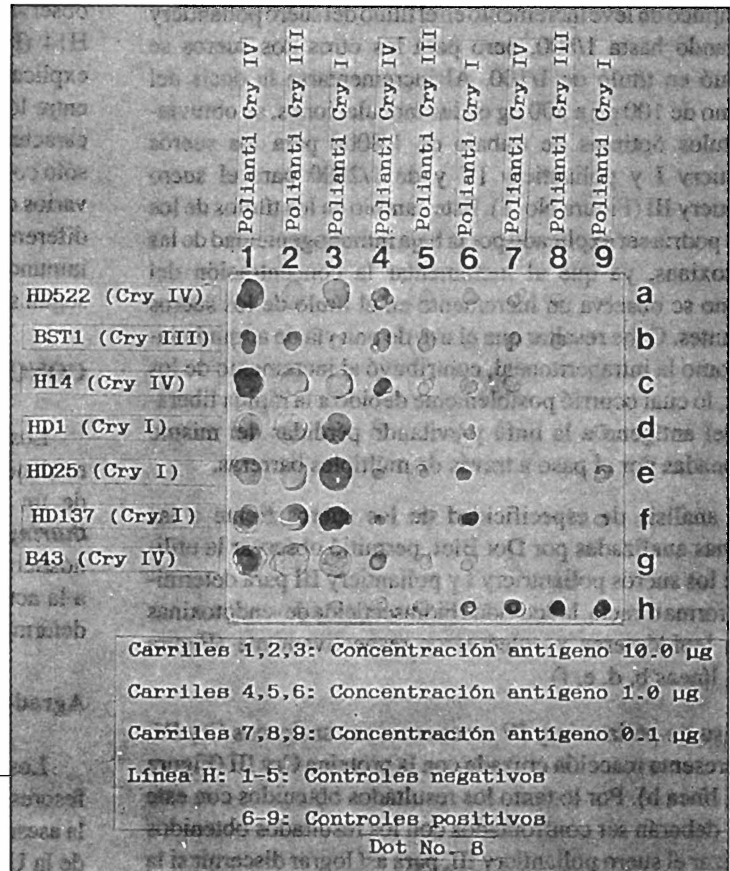
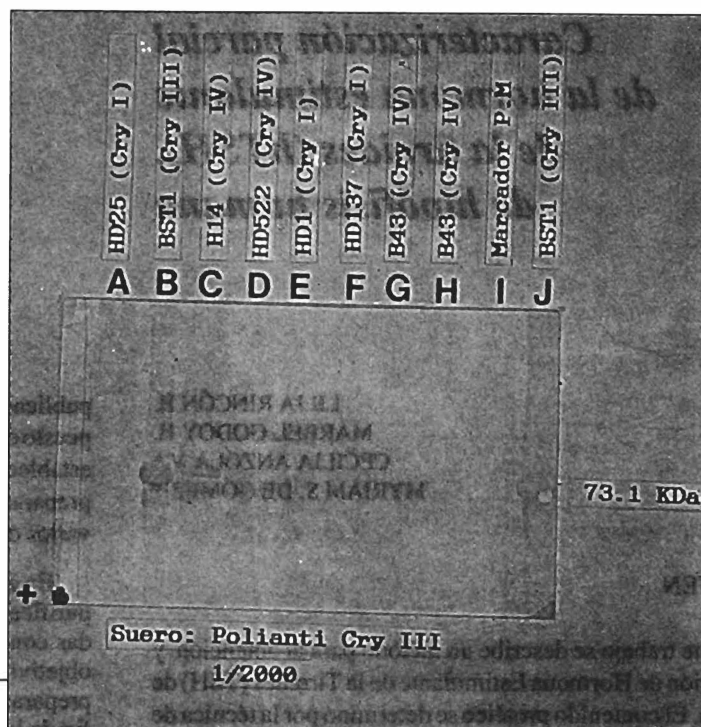


FIGURA No. 3 .
Ensayo por Western-Blot para
los péptidos de d-endotoxinas
de cepas control y patrón
de *Bacillus thuringiensis*.

Suero polianticry III
 a una dilución de 1/ 2000



BIBLIOGRAFIA

1. BRAVO, A., QUINTERO, R., "Importancia y potencial de *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas". Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO). Santiago, Chile 1993.
2. STOCKDALE, H., "Microbial Insecticides", Industrial Chemical Biochemical and Fuels, Shell Research Ltd., Sittin bourne, Kent, U.K. Cap. 46, 1980.
3. DEAN, H.D., "Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*.", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Volumen 2, Capítulo 12, 1984.
4. KHACHATOURIANS, G., "Production and use biological pest control agents". *Trends in Biotechnol.*, 4, 120, 1986.
5. HÖFTE, H., WHITLEY, H.R., "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*", *Microbio. Rev.*, 53, 242, 1989.
6. Tesis de Maestría en Biotecnología. CERÓN, JAIRO. "Establecimiento de estrategias para caracterización y manipulación genética de cepas de *Bacillus thuringiensis*". Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 1991
7. ORTIZ, A., ORTIZ, M., BRAVO, A., QUINTERO, R., "Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del Estado de Morelos" *Universidad: Ciencias y Tecnología.*, 2 (3), 45-49, 1992.
8. ABARCA, C., MARTÍNEZ, J., CARO, B., QUINTERO, R., "Optimización del proceso para producir *Bacillus thuringiensis* var. Aisawai", *Universidad: Ciencias y Tecnología.*, 2, 51, 1992.
9. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N., FARR, A., RANDALL, R., "Protein measurement with Folin phenol reagent"., *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
10. DEUTSCHER, M., "Methods in Enzymology - Guide to protein purification" Academic Press Inc., London (1984) pág. 51-85.
11. CHOMA, C., SUREWICZ, W., CAREY, P., POZGAY, M., RAYNOR, T., KAPLAN, H., "Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*"., *Eur. J. Biochem.*, 189, 527, 1990
12. HARLOW, E., LANE, D., "Antibodies: A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory. New York (1988) pág. 61, 93, 96, 112, 119, 298.
13. GONZÁLEZ, J., BROWN, B., CARLTON, B., "Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for-endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*"., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 6951, 1982.