

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus subtilis*
GENÉTICAMENTE MODIFICADA PARA DESPLEGAR SOBRE SU ESPORA
MOLECULAS BIOACTIVAS**

TESIS

MAESTRIA EN CIENCIAS

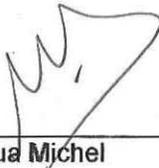
ABIGAIL VALDEZ CASTILLO

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2008.

TESIS DEFENDIDA POR
ABIGAIL VALDEZ CASTILLO
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité



Dr. Jesús Paniagua Michel
Miembro del Comité



Dr. Axayacatl Rocha Olivares
Miembro del Comité



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del programa de posgrado en
Biotecnología Marina*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

22 de agosto de 2008

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGIA MARINA.**

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus subtilis*
GENÉTICAMENTE MODIFICADA PARA DESPLEGAR SOBRE SU ESPORA
MOLÉCULAS BIOACTIVAS.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ABIGAIL VALDEZ CASTILLO

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2008.

RESUMEN de la tesis de **Abigail Valdez Castillo**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en **Biología Marina**. Ensenada, Baja California. Agosto de 2008.

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus subtilis*
GENÉTICAMENTE MODIFICADA PARA DESPLEGAR SOBRE SU ESPORA
MOLÉCULAS BIOACTIVAS.**

Resumen aprobado por:


DR. JORGE OLMOS SOTO

B. subtilis ha sido usada exitosamente como huésped para la producción y secreción de proteínas recombinantes. Con base en los ya reportados sistemas de despliegue en la superficie de esporas de *B. subtilis* destacados por su resistencia, estabilidad, simple y económica producción, rápido crecimiento, sencillos requerimientos nutricionales y secreción eficiente de grandes cantidades de proteínas, se ha elegido para usarla como plataforma de expresión de proteínas de la envoltura externa del Virus de la Mancha Blanca.

El Virus de la Mancha Blanca (WSSV) es un patógeno viral que causa hasta el 100 % de mortalidad en camarones de cultivo resultando en grandes pérdidas económicas en la industria camaronícola por lo que hace deseable el desarrollo de vacunas en contra de este virus. Se ha reportado estimulación y protección en camarones contra WSSV sugiriendo que pudiera existir una respuesta inmune adaptativa en estos organismos.

En este trabajo se integró en el genoma de *Bacillus subtilis* el gene fusión *cyp26* para expresar una proteína de fusión sobre la superficie de la espora de *Bacillus subtilis* usando como proteína portadora a CotC propia de la capa externa de la espora bacteriana fusionada con VP26, que es una de las proteínas estructurales más abundantes de la envoltura del Virus de la Mancha Blanca.

Palabras Clave: *B. subtilis*, Proteínas de la espora, WSSV, Proteínas de la envoltura.

ABSTRACT of the thesis presented by **Abigail Valdez Castillo** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. August 2008.

DESIGN AND CONSTRUCTION OF GENETICALLY MODIFIED *Bacillus subtilis* STRAIN TO DISPLAY BIOACTIVE MOLECULES ON ITS SPORE COAT.

B. subtilis has been successfully used like host of recombinant proteins production and secretion. In base in the spore surface display systems already reported stand out for the stability, resistance, simple and economic production, fast growth rates, simple nutritional requirements and efficient proteins secretion has been chosen to use it like a surface exposed WSSV mayor virion envelope proteins, genetically fused to spore coat proteins.

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a viral pathogen that cause over 100% mortality rates in shrimp farming resulting in heavy economic losses to the shrimp aquaculture industry so the development of vaccines against WSSV would be desirable. Immunostimulation and vaccination of shrimp have been reported suggesting that some sort of adaptative immune response could exist in shrimp.

In this work we integrated a fusion gene, *vp26*, in the *B. subtilis* genome to express a fusion protein on the *B. subtilis* spore coat surface using CotC as a fusion partner and as a passenger protein VP26 that is one of the mayor structural proteins expressed in the virion envelope (WSSV).

Keywords: *B. subtilis*, Spore coat proteins, WSSV, Envelope proteins.

Dedicatorias.

A mis queridos Padres, Roberto Ernesto Valdez Lizarraga por haberme dado una infancia maravillosa, por su valioso ejemplo de esfuerzo y dedicación. A mi madre, Rosa María Castillo Olea por ser la bendición más grande en mi vida, por haber dedicado todas sus fuerzas para mi progreso, por su constante consejo sabio y oportuno, por ser una mujer llena de fortaleza y luz, por el simple hecho de ser maravillosa.

A mi hermana, Jessica Valdez Castillo por todo su apoyo, por compartir momentos inolvidables de nuestra infancia, adolescencia y juventud. Por ser mi amiga y estar siempre cuando la necesito.

A mi esposo, Abelardo Campos Espinoza por ser mi compañero, cómplice y socio de vida. Por su paciencia, ayuda continua y amistad. Por enseñarme que la unión da fortaleza y por aquellos detalles que han dado luz a mi vida.

A mi hija, que está dentro de mi, que aun no la conozco pero ya siento un profundo cariño por ella (28 semanas de embarazo, 22 agosto 2008).

Agradecimientos.

A Conacyt por el financiamiento de mis estudios.

A mi director de tesis, Dr. Jorge Olmos Soto por su continuo apoyo, conocimiento y confianza.

Al técnico del laboratorio, MC. Rosalía Contreras por compartir sus conocimientos y experiencia.

A mis sinodales Dr. Axayacatl Rocha Olivares y Dr. Jesús Paniagua Michel por sus sugerencias para mejorar la calidad del trabajo.

A mis compañeros de generación.

A mi familia por el apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Bacillus subtilis</i>	3
II.2 Estructura de la Espora.....	4
II.3 Formación de la Endospora.....	5
II.4 Morfología de la Espora de <i>Bacillus</i>	6
II.5 Proteínas de la envoltura de la Espora de <i>B. subtilis</i>	7
II.6 Sistema de Despliegue de Proteínas Recombinantes.....	8
II.7 CotB como proteína portadora.....	10
II.8 CotC como proteína portadora.....	11
II.9 <i>B. subtilis</i> como portadores superficiales de antígenos.....	13
II.10 Virus de la Mancha Blanca (WSSV, White Spot Syndrome Virus).....	15
II.11 Propiedades Biológicas.....	16
II.12 Morfología.....	16
II.13 Genoma.....	17
II.14 Proteínas del Virión.....	18
II.15 Expresión de proteínas de WSSV.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIALES Y METODOS	24
V.1 Material Biológico y Plásmidos.....	25
V.2 Tinción Gram y Curva de Crecimiento para <i>Bacillus Subtilis</i>	27

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.3 Diseño de Oligonucleótidos Específicos y Enzimas de Restricción.....	28
V.4 Extracción de ADN cromosomal de <i>B. subtilis</i>	30
V.5 Amplificación de genes <i>cotB</i> y <i>cotC</i> de <i>B. subtilis</i> por PCR.....	32
V.6 Amplificación de genes <i>vp26</i> y <i>vp28</i> de WSSV por PCR.....	32
V.7 PCR Sobrelapante.....	34
V.8 Electroforesis.....	36
V.9 Construcción del plásmido pDGCVP26 a partir de pDG1662 y CVP26....	36
V.9.1 Digestión del plásmido pDG1662 y fragmento CVP26.....	37
V.9.2 Purificación por el método Fenol-Cloroformo.....	38
V.9.3 Ligación del plásmido pDG1662 e inserto CVP26.....	39
V.10 Transformación de <i>E.coli</i> DH5 α con pDGCVP26.....	40
V.11 Purificación de ADN plasmídico.....	40
V.12 Transformación de <i>B. subtilis</i>	41
V.13 Actividad α -amilasa extracelular de <i>B. subtilis</i>	43
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
VI.1 Material Biológico.....	45
VI.2 Tinción Gram y Curva de Crecimiento para <i>B. subtilis</i>	45
VI.3 Diseño de Oligonucleótidos Específicos y Enzimas de Restricción.....	47
VI.4 Amplificación de genes <i>cot</i> de <i>B. subtilis</i> por medio de la técnica de PCR.	50
VI.4.1 Amplificación del gene <i>cotB</i>	50
VI.4.2 Amplificación del gene <i>cotC</i>	51
VI.5 Amplificación de genes <i>vp</i> de WSSV por medio de la técnica de PCR.....	52
VI.5.1 Amplificación del gene <i>vp26</i>	52
VI.5.2 Amplificación del gene <i>vp28</i>	53
VI.6 Fusión en fase de genes <i>cot</i> de <i>B. subtilis</i> y <i>vp</i> de wssv por PCR sobrelapante.	54
VI.6.1 Fusión del gene <i>cotB</i> con el gene <i>vp26</i>	54
VI.6.2 Fusión del gene <i>cotB</i> con el gene <i>vp28</i>	55
VI.6.3 Fusión del gene <i>cotC</i> con el gene <i>vp26</i>	56
VI.6.4 Fusión del gene <i>cotC</i> con el gene <i>vp28</i>	57
VI.7 Construcción del plásmido pDGCVP26 a partir de pDG1662 y CVP26....	58
VI.7.1 Digestión y purificación del plásmido pDG1662 y fragmento CVP26....	58
VI.7.2 Ligación del plásmido pDG1662 e inserto CVP26.....	60
VI.8 Transformación de <i>E.coli</i> DH5 α con pDGCVP26.....	61
VI.9 Transformación de <i>B. subtilis</i> con pDGCVP26.....	64
VI.9.1 Selectividad de colonias por medio de la degradación de almidón.....	65
VI.9.2 Comprobación de la presencia de CVP26 en las clonas seleccionadas.....	66

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII. CONCLUSIONES PUNTUALES.....	68
VIII. PERSPECTIVAS.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	(a,b) <i>Bacillus subtilis</i> , bacteria Gram (+) en forma de bastón. (c) Esporulación en <i>B. subtilis</i>	3
2	Espora de <i>B. subtilis</i> formada de una estructura protéica organizada en capa externa e interna, una corteza y protoplasto....	4
3	Fases del proceso de esporulación en <i>B. subtilis</i>	5
4	Espora de <i>Bacillus subtilis</i> . Formas de vida inactiva que permiten la sobrevivencia en ambientes desfavorables, altamente resistentes a la desecación, radiación y calor, manteniendo un estado metabólico basal.....	7
5	Factores de transcripción que dirigen la expresión genética de la célula madre	8
6	Despliegue en superficie de espora usando proteínas de la envoltura.	9
7	Grupo de 27 aminoácidos repetidos 3 veces en la proteína CotB...	11
8	Secuencia de 66 aminoácidos de la proteína CotC.....	13
9	Morfología externa del Virus de la Mancha Blanca	16
10	Partículas ovoides del Virus del género Whispovirus.....	17
11	Estructura de la proteína VP26 de WSSV.....	19
12	Estructura de la proteína VP28 de WSSV.....	19
13	Esquema del protocolo experimental.....	24
14	Vector de integración pDG1662.....	26
15	Fragmento CVP26.....	37
16	Electroforesis de ADN cromosomal de <i>Bacillus subtilis</i>	45

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
17	Tinción Gram de <i>Bacillus subtilis</i>	46
18	Gráfico de la Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	47
19	(a) Diseño teórico de fragmentos amplificados CotB. (b) Electroforesis.....	50
20	(a) Diseño teórico de fragmentos amplificados CotC. (b) Electroforesis.....	51
21	(a) Diseño teórico de fragmentos amplificados VP26. (b) Electroforesis.....	52
22	(a) Diseño teórico de fragmentos amplificados VP28. (b) Electroforesis.....	53
23	(a) Vista esquemática de la fusión de genes <i>cotB</i> con <i>vp26</i> . (b) Electroforesis.....	54
23	(c) Vista esquemática de la No fusión de genes <i>cotB</i> y <i>vp28</i> . (d) Electroforesis.....	55
24	(a) Vista esquemática de la fusión del gene <i>cotC</i> con <i>vp26</i> . (b) Electroforesis.....	56
24	(c) Vista esquemática de la fusión del gene <i>cotC</i> con <i>vp28</i> . (d) Electroforesis.....	57
25	Digestión de pDG1662 con EcoRI y EcoRV.....	59
26	Gel de electroforesis con fragmento CVP26 digerido y purificado.	60
27	Plásmido pDGCVP26, resultado de la inserción del gene <i>cvp26</i> en el vector de integración pDG1662.....	61
28	Electroforesis de la extracción y purificación de ADN plasmídico de las 18 colonias que presentaron resistencia a ampicilina como consecuencia de la transformación con pDGCVP26.....	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
29	Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de CVP26 en la clona 3.....	63
30	Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de CVP26 en las clonas 10–13.....	63
31	Amplificación de CotC y VP26 en las 5 clonas que amplificaron el fragmento fusión CVP26.....	64
32	(a) Cultivo de <i>B. subtilis</i> transformada con pDGCVP26. (b) Tinción de yodo sobre el almidón del medio.....	65
33	Electroforesis de la extracción y purificación de ADN cromosomal de <i>B. subtilis</i>	66
34	Electroforesis donde se muestra la amplificación de CVP26 en las clonas 3, 5 y 8.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Material Biológico utilizado en el transcurso de este trabajo.....	25
II	Plásmidos usados en este trabajo.....	26
III	Enzimas de Restricción usadas en este trabajo.....	29
IV	Oligonucleótidos diseñados para amplificación de fragmentos mediante la técnica de PCR.....	29
V	Reacción de PCR.....	33
VI	Programa para amplificación de <i>cotB</i>	33
VII	Programa para amplificación de <i>cotC</i>	33
VIII	Programa para amplificación de <i>vp26</i> y <i>vp28</i>	34
VIX	Reacción de PCR (1er. Etapa).....	34
X	Programa para fusión de <i>cotC</i> y <i>vp26</i>	35
XI	Programa para amplificación del fragmento CVP26.....	35
XII	Reacción de Digestión.....	37
XIII	Reacción de Ligación.....	39
XIV	Temperaturas de hibridación para cada fragmento amplificado...	48
XV	Temperatura de fusión, Secuencia, Enzima de restricción y Posición de alineamiento de los Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de <i>cotB</i> , <i>cotC</i> y <i>vp26</i> , <i>vp28</i>	49
XVI	UFC obtenidas en la transformación de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α con pDGCVP26.....	62

I. INTRODUCCIÓN

La presentación de proteínas heterólogas en una forma activa es una tarea importante con potenciales aplicaciones en una variedad de campos como ha sido el desarrollo de vacunas eficientes para el tratamiento de infecciones microbianas, desarrollándose sistemas de despliegue expresando polipéptidos heterólogos sobre la superficie celular.

En bacterias Gram (-) varias proteínas de superficie han sido usadas como fusiones para la expresión de antígenos bacteriales y virales e inducir respuesta de anticuerpos específicos en animales inmunizados con la bacteria recombinante. Varias bacterias Gram (+) han sido usadas para la expresión de proteínas heterólogas, principalmente determinantes antigénicos para la inducción de respuesta de anticuerpos en animales (Isticato, 2001).

Entre las especies de *Bacillus*, *Bacillus subtilis* ha llamado la atención no solamente por su seguridad al ser considerada un organismo GRAS, Generally Recognized as Safe, (Westers, *et al*, 2004), sino también porque existe amplia disponibilidad de herramientas y datos genómicos, sus sistemas de expresión están bien establecidos y se tiene un detallado conocimiento de la estructura de su espora (Olmos, 2003).

B. subtilis ha sido usada como huésped para la producción de proteínas heterólogas (Lam, 1998), y la secreción de proteínas recombinantes ha sido desarrollada y usada exitosamente (Pero, 1993). Se han reportado sistemas de despliegue en superficie basados en el uso de esporas bacterianas de *B. subtilis* (Isticato, 2001).

La espora es un atractivo vector de moléculas biológicamente activas al presentar ventajas potenciales, como su alta resistencia y estabilidad, su simple y económica

producción, rápido crecimiento y una secreción eficiente de grandes cantidades de proteínas (Driks, 1999; Henriques, 2000).

Es usada como aditivo alimenticio y tratamiento de desordenes gastrointestinales (Green, 1999; Hoa, 2000).

El Virus de la Mancha Blanca (WSSV) es un patógeno viral que causa hasta el 100 % de mortalidad en camarones de cultivo resultando en grandes pérdidas económicas en la industria camaronícola (Lightner, 1996).

Se ha reportado estimulación y protección en camarones contra WSSV (Venegas, 2000; Wu, 2002) sugiriendo que pudiera existir una respuesta inmune adaptativa en estos organismos (Kurtz, 2003; Witteveldt, 2004), por lo que hace deseable el desarrollo de vacunas en contra de este virus.

En este trabajo se espera construir una cepa de *Bacillus subtilis* que pueda expresar una proteína de fusión sobre la superficie de su espora, usando como proteína portadora a CotC y como proteína pasajero a VP26, que es una de las proteínas estructurales más abundantes expresadas en la envoltura del Virus de la Mancha Blanca (Xuhua, 2007).

II. ANTECEDENTES

II.1 *Bacillus subtilis*.

Algunas especies de *Bacillus*, particularmente cepas de *B. subtilis*, han sido empleadas en la producción de antígenos heterólogos debido a la disponibilidad de varios sistemas de expresión bien establecidos y a la habilidad para secretar proteínas recombinantes en el medio de cultivo. A pesar de estas características atractivas sólo un número pequeño de grupos de investigación han trabajado consistentemente con cepas recombinantes de *B. subtilis* como huésped para la expresión de antígenos con aplicaciones potenciales como vacunas (Ferreira, 2005).

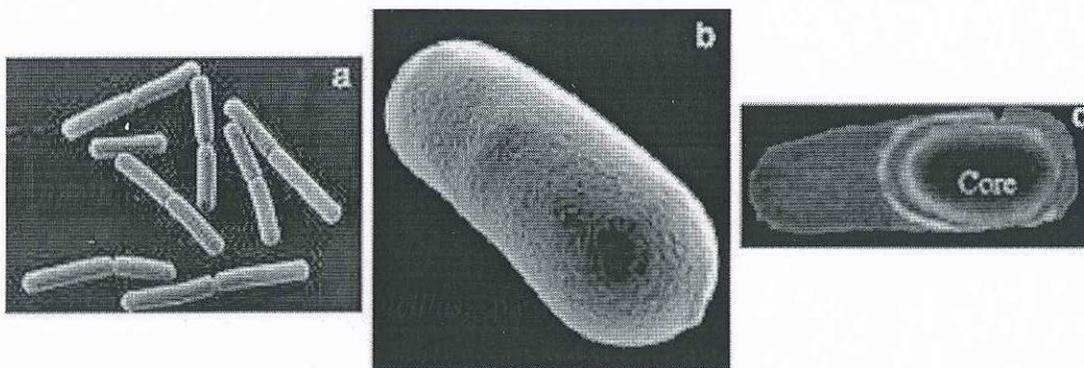


Figura 1. (a,b) *Bacillus subtilis*, bacteria Gram (+) en forma de bastón. (c) Esporulación en *B. subtilis*.

Fuente: <http://espanol.istockphoto.com>.

Bacillus subtilis es la mejor caracterizada de las bacterias Gram (+), su genoma consta de 4, 214,810 pb (Kunst, *et al.*, 1997). Es aerobia con forma de bastón (fig. 1 a, b) y en condiciones adversas esporula (fig. 1c), comúnmente se encuentra en el suelo, agua y en asociación con plantas. Es una fuente importante de enzimas industriales como amilasas y proteasas. Ha sido usada para estudios de secreción de proteínas y para el desarrollo, como hospedero, de producción de proteínas heterólogas (Isticato, 2001).

Bajo condiciones de inanición *B. subtilis* cesa su crecimiento e inicia reacciones de restauración modificando su metabolismo. Esta respuesta incluye la inducción de motilidad y quimiotaxis, así como la producción de hidrolasas (proteasas y carbohidrasas) y antibióticos. Si esta respuesta fracasa en restablecer el crecimiento las células son inducidas a formar endosporas resistentes a químicos, irradiación y desecación (Nicholson, 2000).

La primera indicación morfológica de esporulación involucra una perturbación del ciclo celular normal, se divide la célula en una pequeña espora y una larga célula madre cada una con una copia entera del cromosoma. Posteriormente se presenta la muerte programada (apoptosis) de la célula madre y liberación de la espora madura (Kunst, *et al*, 1997).

II.2 Estructura de la Espora.

La estructura de la espora es mucho más compleja que la de la célula vegetativa al poseer múltiples capas. La capa más externa es el exosporium, una fina y delicada cubierta de naturaleza proteica. Por dentro de esta se localizan las cubiertas de la espora que se componen de capas de proteína. Bajo la cubierta de la espora se encuentra el córtex (corteza) que no es más que una capa de peptidoglicano con uniones laxas, y por dentro del córtex está el núcleo o protoplasto de la espora (fig. 2).

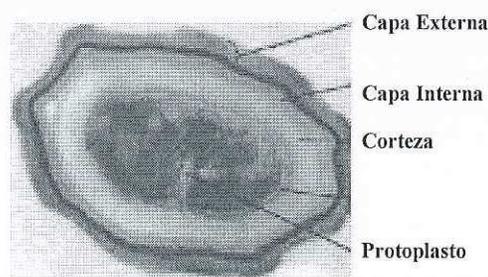


Figura 2. Espora de *B. subtilis* formada de una estructura protéica organizada en capa externa e interna, una corteza y protoplasto (Driks, 1999).

II.3 Formación de la endospora.

Durante la formación de la endospora, una célula vegetativa se convierte en una estructura termorresistente. La esporulación implica una serie muy compleja de eventos en la diferenciación celular. La esporulación bacteriana no se produce durante el crecimiento exponencial de las células, sino únicamente al cesar el crecimiento como consecuencia del gasto de los nutrientes esenciales. De ahí que las células de *Bacillus*, cesen su crecimiento vegetativo y empiecen a esporular cuando se limita la disponibilidad de un nutriente esencial como el carbono o el nitrógeno. El paso del crecimiento vegetativo a la esporulación se basa en muchos cambios en la expresión de los genes de la célula. En la figura 3 se muestran los cambios estructurales que acontecen en las células de *Bacillus* que esporulan.

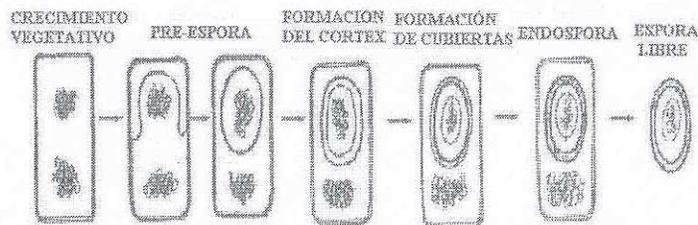


Figura 3. Fases del proceso de esporulación en *B. subtilis*.

Fuente: es.geocities.com/joakinicu/apartado31.htm

En *Bacillus subtilis* se ha estudiado en detalle la esporulación, un proceso que dura de 5-8h. Los estudios genéticos de mutantes de *Bacillus*, cada uno de los cuales presenta un bloqueo en una de las fases de la esporulación, han puesto de manifiesto la implicación de 200 genes en el proceso de esporulación. La esporulación requiere el cese de la síntesis de algunas proteínas implicadas en funciones vegetativas de la célula y la fabricación de proteínas específicas de la spora. Esto se lleva a cabo mediante la activación de distintos genes específicos de esporas incluyendo *spo*, *ssp* (Driks, 1999) y muchos otros genes en

respuesta a estímulos del entorno para el inicio de la esporulación. Las proteínas codificadas por estos genes catalizan la serie de eventos que transforman a una célula vegetativa hidratada y metabólicamente activa en una endospora deshidratada y metabólicamente inerte, aunque muy resistente.

II.4 Morfología de la Espora de *Bacillus*.

Las esporas son formas de vida inactivas que pueden sobrevivir indefinidamente en estado de desecación y permanecer intactas por millones de años. Pueden resistir temperaturas tan altas como 90 °C así como a la exposición de químicos nocivos (Nicholson, 2000). La mayoría de las bacterias que forman esporas pertenecen a dos géneros principales *Bacillus* y *Clostridium*, éste último a diferencia de *Bacillus* sólo se presenta bajo condiciones anaeróbicas, siendo *Bacillus* el género más favorable para estudio.

Las especies de *Bacillus* producen una espora o endospora dentro de la célula bacteriana por un proceso de diferenciación requiriendo la acción coordinada de cientos de genes en desarrollo. Las esporas maduras tienen una longitud de 0.8 – 1.2 μm con forma esférica o elíptica. El cromosoma bacteriano se condensa en el centro de la espora conocido como núcleo rodeado de capas de membranas lipídicas y peptidoglucanos modificados, pero la estructura más importante es la envoltura de la espora, flexible y con capacidad de expandirse y contraerse otorgando a la espora resistencia a solventes orgánicos y lisozima (Venkata, 2003), fig. 4.

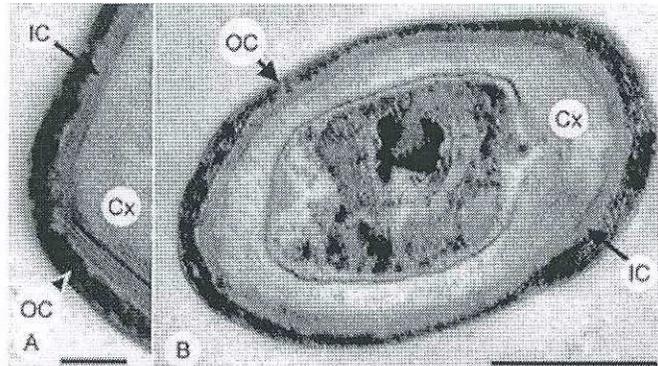


Figura 4. Espora de *Bacillus subtilis*. Formas de vida inactiva que permiten la sobrevivencia en ambientes desfavorables, altamente resistentes a la desecación, radiación y calor, manteniendo un estado metabólico basal. OC, Capa externa; IC, Capa interna; Cx, Córtex (Driks, 1999).

II.5 Proteínas de la Envoltura de la Espora de *B. subtilis*.

La envoltura de las esporas de *B. subtilis* están cubiertas de un grupo heterogéneo de más de 25 polipéptidos arreglados en tres capas estructurales: una envoltura interna difusa, una capa laminada interna y una envoltura externa gruesa electro-densa, esta última presenta 5 proteínas principales CotA (65kDa), CotB (59 kDa), CotG (24kDa), CotC (11kDa) y CotF (8kDa), Driks, 1999.

Varios genes estructurales de las proteínas *cot* han sido identificados. La expresión de todos los genes *cot* está gobernada por una cascada de cuatro factores de transcripción, actuando específicamente en el compartimento de la célula madre del esporangio, fig. 5, (Driks, 1999; Istickato, *et al.*, 2004).

Experimentos de mapeo genético demostraron que *cotA*, *cotB*, *cotC* y *cotD* estaban localizados a 52, 290, 168 y 200 grados, respectivamente en el cromosoma de *B. subtilis* (Donovan *et al.*, 1987).

Zheng y colaboradores en 1990 reportaron que la transcripción de genes *cotB*, *cotC* y *cotD* está gobernada por un único promotor y que la transcripción del gen *cotE* está gobernada por una cadena de promotores designados como P1 y P2. Así mismo que los genes designados como *cotB* al *cotE* codifican para polipéptidos de 59, 12, 11 y 24 kDa, respectivamente.

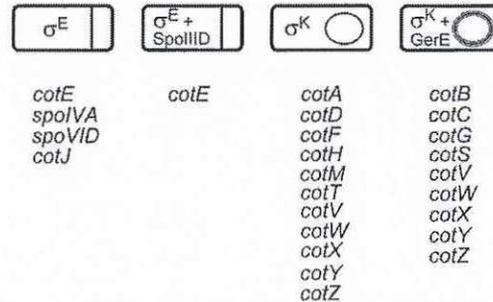


Figura 5. Factores de transcripción que dirigen la expresión genética de la célula madre, se muestran en el interior del compartimento celular. Debajo de cada célula están los genes que se activan para la expresión de proteínas de la envoltura (Driks, 1999).

II.6 Sistema de Despliegue de Proteínas Recombinantes.

Algunas proteínas con alta actividad antigénica o farmacológica, expresadas en un huésped apropiado, han sido usadas para el desarrollo de nuevas vacunas y drogas. Estas proteínas recombinantes sobre la superficie celular se obtienen a partir de fusiones de genes usando secuencias de dominios de anclaje de membrana de proteínas superficiales (Lee, 2003).

Cada sistema de despliegue en superficie involucra por lo menos dos componentes: una proteína portadora anclada sobre la superficie celular y una proteína pasajero expuesta por fuera de la célula (Fig. 6). Varias características de las proteínas portadoras pueden afectar la eficiencia del despliegue en superficie y tienen diferentes efectos en la estabilidad e integridad de la célula huésped. Una proteína portadora debe poseer un péptido señal

eficiente para permitir que la proteína fusión vaya por la membrana interna, un motivo de anclaje fuerte para evitar que se desprenda de la superficie y ser resistente a proteasas presentes en el medio extracelular o en el espacio periplásmico (Ricca y Cutting, 2003).

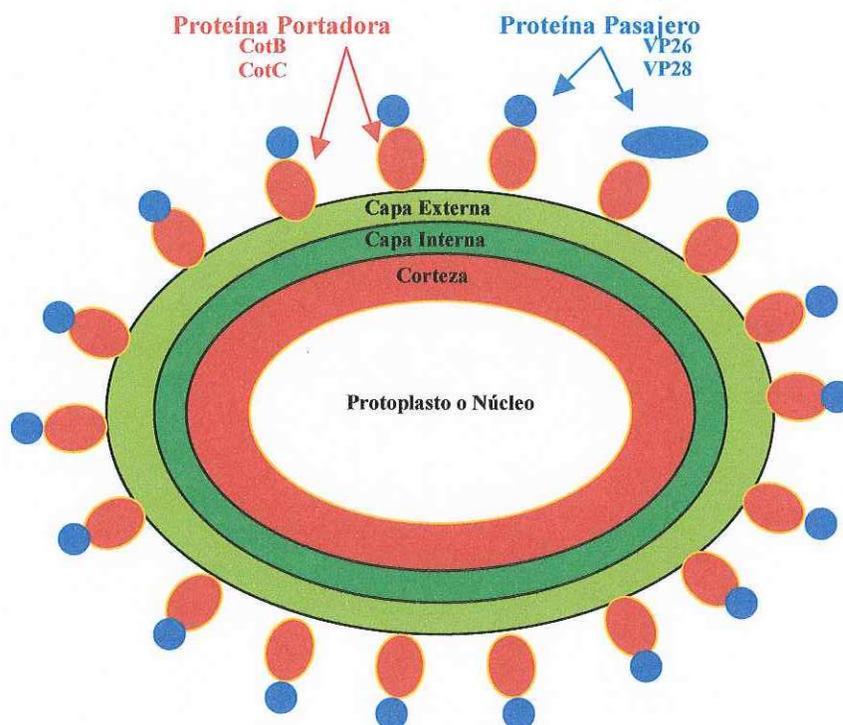


Figura 6. Despliegue en superficie de espora usando proteínas de la envoltura. La espora de *B. subtilis* está compuesta de un protoplasto interno (blanco) rodeado por una corteza peptidoglucano (rojo) y una envoltura proteínica subdividida en parte interna (verde) y externa (verde). La proteína de fusión, compuesta de una portadora (roja) y pasajero (azul), está expuesta en la superficie de la espora. Modificado de Ricca, 2003.

La localización de inserción, o fusión, de la proteína heteróloga en la proteína portadora es otro factor importante, ya que puede influenciar en la estabilidad, la actividad y modificaciones post-traduccionales de la proteína fusión. Por lo tanto, fusiones en N-terminal, C-terminal o en el interior de la proteína portadora son en algunos casos

construídas con el mismo pasajero para obtener un despliegue eficiente (Ricca y Cutting, 2003; Istatico, 1997).

Algunas características de la proteína pasajero pueden afectar procesos de translocación y despliegue de superficie final como la estructura de plegamiento de la proteína pasajero así como la formación de enlaces disulfuro en el lado del periplásma de la membrana externa (Maurer J., 1997) o la presencia de algunos residuos cargados o hidrofóbicos (Nguyen, 1995).

Un sistema de despliegue basado en esporas proporciona varias ventajas con respecto a sistemas basados en el uso de células bacterianas, esto incluye la robustez de la espora bacteriana permitiendo almacenarse en forma deshidratada, su producción es fácil y segura y cuenta con una plataforma tecnológica adecuada para su manipulación genética (Istatico, 2001).

La expresión de proteínas heterólogas sobre la superficie de la espora de *B. subtilis* se ha enfocado en dos componentes de la envoltura (Istatico, 2001) indispensables para la germinación y formación de una espora (Ricca y Cutting, 2003). La proteína CotB al ser de las primeras en ser utilizadas como portadoras y CotC que en comparación con otras proteínas de la envoltura, presenta una alta abundancia relativa (Mauriello, 2004).

II.7 CotB como proteína portadora.

CotB ha sido asociada a la envoltura de la capa externa de la espora sobre evidencias genéticas (Zheng, 1990). Análisis inmunocitofluorimétricos realizados sobre esporas intactas han mostrado que CotB es accesible a anticuerpos específicos y por lo tanto existe una mayor probabilidad de exposición sobre la superficie de la espora (Istatico, 2001).

PAGE, a un polipéptido de 12 kDa (Donovan 1987). CotC, está asociada a la capa externa de la envoltura de la espora de *B. subtilis* (Zheng, 1990). Inicialmente fue considerada como proteína portadora por su abundancia relativa en la envoltura. Junto con CotG y CotD, CotC representa cerca del 50 % del total de las proteínas solubles de la envoltura (Isticato, 2004), permitiendo el ensamblaje de un número significativo de quimeras CotC sobre la envoltura, asegurando un eficiente despliegue heterólogo (Ricca y Cutting, 2003).

La expresión del gen *cotC* está bajo el control de la célula madre específica σ^k y reguladores transcripcionales GerE y SpoIIID. Como en el caso de CotB, CotC también se transcribe en la célula madre y su ensamblaje sobre la envoltura no requiere translocación de la membrana (Ricca y Cutting, 2003). El primer producto del gen *cotC* es un polipéptido de 66 aminoácidos extremadamente ricos en tirosina (30.3% del total de los residuos) y lisina (28.8%), fig. 8 (Donovan, 1987). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que CotC se ensambla en al menos 4 distintas formas protéicas, variando en tamaño entre 12 y 30 kDa (Isticato, 2004). Dos de estas, tienen masas moleculares de 12 y 21 kDa correspondiendo a formas monomérica y homodimérica respectivamente, son ensambladas en la espora en formación después de su síntesis 8 horas después del inicio de esporulación, su ensamblaje es inmediatamente después de su síntesis en el compartimento de la célula madre. Las otras dos formas, 12.5 y 30 kDa, aparecen dos horas después, estas son generadas sobre la envoltura de la espora ya que no se encuentran en la célula madre, son probablemente los productos de modificaciones post-traduccionales de las dos previas formas ensambladas, ocurriendo directamente en la superficie de la envoltura durante la maduración de la espora (Isticato, 2004). El ensamblaje de estos cuatro polipéptidos dependientes de CotC en la envoltura de la espora, estrictamente requieren de la expresión de los genes *cotE* y *cotH*, y en adición, el ensamblaje del polipéptido de 30 kDa es parcialmente dependiente de la expresión del gen *cotB* (Isticato, 2004).

10	20	30	40
MGYYKKYKEE	YYTVKKTYYK	KYYEYDKKDY	DCDYDKKYDD
50	60		
YDKKYYDHDK	KDYDYVVEYK	KHKKHY	

Figura 8. Secuencia de 66 aminoácidos de CotC.

Fuente: http://www.expasy.org/uniprot/COTC_BACSU

II.9 *B. subtilis* como portadores superficiales de antígenos.

El uso de *B. subtilis* genéticamente modificado ha confiado en su habilidad de formar endosporas. Las esporas de *B. subtilis* tienen aplicaciones terapéuticas como probióticos tanto en humanos como en animales (Mazza, 1994).

B. subtilis ha sido recientemente reportado como portador vivo de vacunas antigénicas. Tal es el caso del antígeno de protección (PA) proteína altamente patógena producida por *B. anthracis*, que se encuentra disponible en la vacuna contra el anthrax. La purificación de PA y su expresión por cepas recombinantes de *B. subtilis* representan una segura opción para la producción de vacunas anti-anthrax. Los cultivos de *B. subtilis* probaron ser completamente inmunogénicos y confirieron protección a ratones y cerdos de Guinea inyectados con dosis letales de esporas de *B. anthracis* (Ivins y Welkos, 1986; McBride, *et al*, 1998).

Se han reportado esporas recombinantes de *B. subtilis* como portadoras en superficie de antígenos e inductoras de respuesta de anticuerpos específicos en ratones, por lo que han sido recibidas como alternativas nuevas y prometedoras para el desarrollo de vacunas orales (Duc y Cutting, 2003; Oggioni, *et al*. 2003; Ricca y Cutting, 2003).

Dos proteínas de la envoltura de la espora, CotB y CotC, han sido usadas para desplegar el fragmento C de la toxina de tetano (TTFC) de *Clostridium tetani* y la subunidad B de la toxina (LTB) producida por algunas cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (ETEC) como proteínas de fusión expresadas sobre la superficie de esporas de *B. subtilis*

(Isticato, *et al.* 2001; Duc, *et al.* 2003a; Mauriello, *et al.* 2004). Ambos antígenos fueron expresados como fusiones C-terminales con proteínas Cot, que están ancladas a la capa externa de la envoltura de la espora con un número aproximado de 1,000 moléculas/espora (Isticato, *et al.* 2001; Duc, *et al.* 2003a).

Las esporas de *B. subtilis* han sido empleadas eficientemente como portadores vivos de vacunas antigénicas en ratones (Duc, 2003a). Mauriello, 2004 sugiere que la inmunización oral en ratones con esporas recombinantes de *B. subtilis* requiere de altas cargas de antígeno (por arriba de 10^{10} esporas/ml) e inmunizaciones repetidas.

Se han usado esporas expresando CotB Δ_{105} -TTFC para inmunizar a ratones por vía oral. Después de 33 días de dosificación, los ratones estimulados con una dosis de 10 DL₅₀, con la toxina del tetano estuvieron protegidos. De ocho ratones estimulados con una dosis de 20 DL₅₀, sobrevivieron siete. Este estudio muestra que las esporas expresando antígenos heterólogos pueden ser usadas para inmunización (Duc, 2003).

Como sustrato o vehículo de entrega de biomoléculas, la envoltura protectora de la espora bacterial ha demostrado proporcionar una superficie apta para el despliegue de antígenos heterólogos, incluso dos antígenos diferentes pueden desplegarse simultáneamente usando a CotB y CotC como proteínas presentadoras (Mauriello, 2004).

Como vacuna, las esporas tienen un número de ventajas por encima de otros sistemas. Sin embargo, el mismo sistema portador, CotB y CotC, puede ser usado incluso para la producción de proteínas importantes para la industria o drogas (Ricca y Cutting, 2003).

II.10 VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV, White Spot Syndrome Virus).

En México existen 402 granjas (45 mil Ha) destinadas al cultivo de camarón, ubicadas en Sonora, Sinaloa y Nayarit. Pero aunque el área sujeta a explotación ha mostrado un incremento superior a 90% en los últimos tres años, las epizootias por enfermedades virales han sido más severas, y frecuentemente causan elevadas mortalidades y pérdida de las cosechas, ocasionando serios estragos en la industria. Entre las patologías de mayor importancia en la acuicultura mundial del camarón sobresalen las ocasionadas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca por su capacidad de dispersión, amplio rango de hospederos y daños económicos (Molina, 2007).

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es una infección viral de los camarones peneidos. La enfermedad es altamente mortal y contagiosa, matando a los organismos rápidamente. El primer reporte epidemiológico fue en 1992 en Taiwan (Chou, 1995), en 1993 en China donde se reportó un colapso en la industria camaronera debido a este virus, en el mismo año se presentó en Japón y Korea; en 1994 en Tailandia, India y Malasia y para 1996 ya estaba afectada severamente el este y sur de Asia. A finales de 1995 se reportó en USA, en 1998 en centro y sur de América, para 1999 en México y en el 2000 en las Filipinas. Actualmente es bien conocida su presencia en todas las regiones de crecimiento de camarón excepto en Australia (Vlak, 2002).

WSSV es causado por una familia de virus conocida como Complejo del Síndrome de Baculovirus de la Mancha Blanca. Anteriormente se encontraba en la familia *Baculoviridae* por su forma de barra y morfología de su envoltura. Con base en su morfología, estructura y composición genómica y en análisis filogenéticos este virus es miembro del género *Whispovirus* (Van Hulten y Vlak, 2000) en una nueva familia llamada *Nimaviridae* debido a la extensión polar en forma de hilo sobre el virus, fig. 9, (Vlak, 2002).

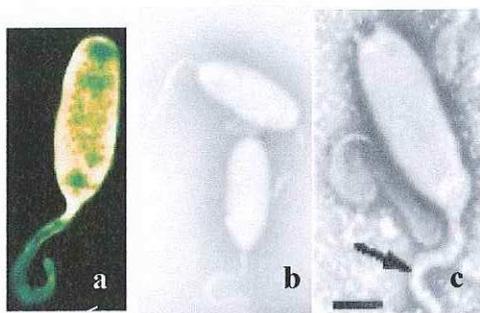


Figura 9. (a, b, c) Morfología externa del Virus de la Mancha Blanca donde se expone su estructura proteica en forma de hilo en uno de los extremos polares cacterístico de la familia Nimaviridae (Vlak, 2002).

II.11 Propiedades Biológicas.

El género *Whispovirus* tiene un amplio rango de huéspedes, crustáceos de agua salada y salobre, es altamente virulento y provoca mortalidades del 100% en un rango de 3 a 7 días en camarones de cultivo. La replicación del virus inicia en el núcleo de la célula huésped, donde los viriones son ensamblados. Estos son liberados de la célula infectada por ruptura celular (Chaivisuthangkura, 2004; Witteveldt, 2004; Yang, 2001).

Los blancos de infección en el camarón son tejido ecto y mesodérmico como las branquias, órgano linfático y epitelio cuticular. Los signos clínicos incluyen una disminución repentina en el consumo de alimento, letargia, cutícula blanda, coloración rojiza de apéndices y manchas blancas sobre el exoesqueleto (Vlak, 2002).

II.12 Morfología.

Los virus del género *Whispovirus* son partículas ovoides de cerca de 275 nm de largo y 120 nm de ancho con un apéndice flagelar en uno de sus extremos (Fig. 9 y 10). El virión tiene una nucleocápside cerca de 200 x 65 nm, con una pared externa de 6 nm, tiene

forma de barra rodeada de una cubierta trilaminar de 6 a 7 nm de grosor. La nucleocápside contiene una molécula circular de doble cadena de ADN, su núcleo es altamente electrodenso. El área entre la nucleocápside y la envoltura varía de 2 a 7.5 nm. La nucleocápside exhibe extremos asimétricos, uno redondo y otro en forma cuadrada, con una apariencia superficialmente segmentada, fig. 10d (Durand, 1997). Tsai en el 2006 propone que el virión consiste no solamente de una cubierta y nucleocápside sino que incluye una capa intermedia conocida como tegumento.

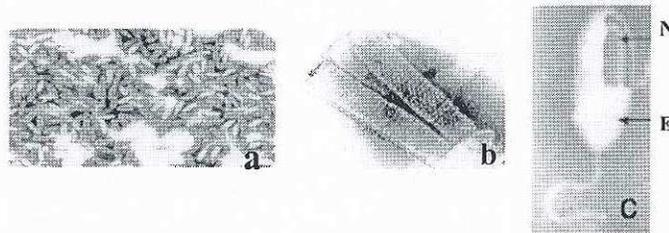


Figura 10. (a), Partículas ovoides del Virus del género Whispovirus. (b), Nucleocápside con superficie segmentada y extremos asimétricos. (c), E: envoltura N: nucleocápside (Durand, 1997).

II.13 Genoma.

El genoma completo del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) consta de una doble cadena circular de ADN de 305,107 pb. El 3% del genoma está conformado de 9 regiones homólogas, mientras que el resto (97%) de las secuencias son únicas. El genoma tiene un contenido total de G + C del 41%. Un total de 531 supuestos ORFs (Open reading Frames, Marcos de Lectura Abiertos) fueron identificados por análisis de secuencia, entre los cuales 181 ORFs probablemente codifican a proteínas funcionales (Yang, 2001). Una característica del genoma de WSSV es la presencia de un ORF muy largo de 18,234 nucleótidos, con función desconocida (Vlak, *et al*, 2002).

II.14 Proteínas del Virión.

El virión, es la fase extracelular del virus que posee la capacidad de portar el mensaje genético a la célula hospedadora, se han identificado cerca de 40 proteínas estructurales (Tsai, 2004). De las cuales VP28, VP26, VP24 y VP19 son consideradas como proteínas mayores (Xuhua, 2007) y por lo menos 13 proteínas menores (Van Hulten, 2000; Wang, 2000).

Es bien conocido que las proteínas de la envoltura juegan un papel importante en las infecciones virales en algunas especies. Van Hulten y colaboradores en el 2000 identificaron los genes, *vp26* y *vp28*, que codifican para las proteínas estructurales mayores VP26 y VP28. Estas proteínas son las más abundantes de la envoltura, corresponden el 60% del total de las proteínas (Xuhua, 2007). Se identificó a VP26 como una proteína de la nucleocápside (Van Hulten, 2000) pero en el 2006 Tsai reportó que es una proteína mayor del tegumento que está asociada con la envoltura y la nucleocápside. Recientemente se propone que es una proteína de la envoltura (Xuhua, 2007). Por medio de microscopía inmunolectrónica (IEM) se identificó a VP26 y VP28 como proteínas de la envoltura del virión (Leu, 2005).

Las proteínas VP26 y VP28 muestran un 41% de similitud en sus aminoácidos y presentan una región altamente hidrofóbica (Xuhua, 2007). Tienen una región transmembrana aproximadamente de 30 aminoácidos de longitud en el extremo N terminal. Ambas proteínas tienen una región sobresaliente N terminal, la diferencia más significativa entre ellas es una lamina beta extendida en VP26 y una hélice alfa en VP28. En VP26 el extremo N y C terminal se unen para formar a dos laminas beta. En VP28, el extremo N terminal sobresale una hélice alfa por fuera de una lámina beta (Fig. 11 y 12).

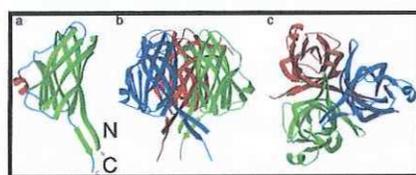


Figura 11. Estructura de VP26. (a) Monomero de VP26 **(b)** Trímero de VP26 **(c)** Vista aérea del trímero (Xuhua, 2007).

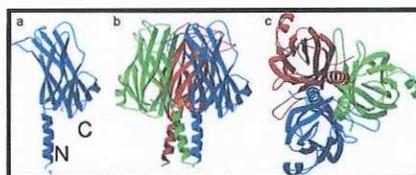


Figura 12. Estructura de VP28. (a) Monomero de VP28 **(b)** Trímero de VP28 **(c)** Vista aérea del trímero (Xuhua, 2007).

Xuhua en el 2007 propone que los trimeros de VP26 y VP28 pueden tener una función importante y posiblemente el anclaje de la envoltura permita al trímero interactuar con el huésped durante la infección.

El tamaño teórico de VP28 (22.1 kDa) difiere por 6 kDa de su tamaño aparente en SDS-PAGE (28 kDa), que probablemente sea el resultado de modificaciones post-traduccionales (Van Hulten, *et al.*, 2001). Se ha identificado que esta proteína se une a las células del camarón, e incluso se ha demostrado que tiene un papel significativo en la interacción virus-célula (Van Hulten, 2001; Vlask, 2002; Yi, 2004).

Yi en el 2004 demostró que solo en pH bajo VP28 puede unirse a las células del camarón y así ayudar al virus a entrar al citoplasma. Recientemente se ha demostrado que las interacciones entre el huésped y WSSV están mediadas por la proteína *PmRab7* del huésped y VP28 del virus (Sritunyaluksana, *et al.*, 2006).

II.15 Expresión de proteínas de WSSV.

La ventaja de un sistema de expresión es que una proteína pueda ser fácilmente obtenida en altas cantidades y en forma pura. Está demostrado que es posible inducir alta resistencia en camarones por inyección de proteínas recombinantes. De ahí, las proteínas recombinantes producidas son un candidato efectivo como vacunas orales contra WSSV

(Jha y Xu, 2005).

La proteína de la envoltura del Virus de la Mancha Blanca, VP28 ha sido expresada en *Escherichia coli* y usada como antígeno para la producción de anticuerpos monoclonales. Una porción del gen *vp28* ha sido clonado en un vector de expresión y transformado en *E. coli*. El objetivo fue producir proteína VP28 sin la región transmembrana N terminal (Chaivisuthangkura, *et al.*, 2004).

Debido a la importancia económica del cultivo del camarón y su alta producción, el desarrollo de vacunas contra WSSV es muy deseable. La idea de vacunar al camarón o invertebrados en general, parece poco práctica ya que carecen de respuesta inmune adaptativa y solamente se confía en las respuestas innatas. Sin embargo, un estudio reciente en el copépodo *Macrocyclus albidus* mostró que el sistema de defensa de invertebrados reacciona con mayor eficiencia después de ser previamente tratado con un antígeno similar sugiriendo la existencia de memoria inmunológica específica (Kurtz, 2003).

Witteveldt y colaboradores en el 2004 inactivaron una bacteria, *E. coli*, y sobreexpusieron las proteínas VP19 y VP28, adicionándolas en el alimento comercial del camarón *Penaeus japonicus* demostrando que las tasas más bajas de mortalidad eran para aquellos organismos alimentados con pellet adicionado con VP28.

Se seleccionaron dos proteínas mayores del WSSV, la VP19 y VP28, para usarlas como vacuna en el camarón *Penaeus monodon*. Se realizaron expresiones múltiples en *E. coli* usando ORFs completos y parciales. La mayor expresión de VP28 se obtuvo en fusión con (HIS)6-tag omitiendo el dominio N terminal hidrofóbico. La vacuna con VP28 mostró los valores más altos de porcentaje relativo de sobrevivencia así como una mortalidad inicial baja comparada con otros grupos. Se seleccionaron al azar sobrevivientes y dieron negativo a WSSV (Witteveldt, 2006, Cap. 6).

Se ha aceptado que los invertebrados como el camarón no presentan una respuesta

adaptativa inmunológica comparable a la que presentan los vertebrados. Sin embargo, en los últimos años varios estudios han demostrado o sugerido la existencia de tal respuesta en invertebrados. Como es el caso de *Litopenaeus vannamei* que fue vacunado oralmente por 7 días con *Escherichia coli* (BL21) inactivada sobreexpresando VP28 y posteriormente infectado con WSSV (Wang, 1998), presentando una mortalidad acumulada significativamente baja. Todos los organismos muertos durante el experimento dieron positivo a la prueba de PCR para WSSV mientras que los organismos sobrevivientes dieron negativo a la prueba (Witteveldt, 2006, Cap. 8).

Estos experimentos demostraron que la vacuna oral para las dos especies más importantes de camarones cultivados puede ser realizada con éxito. Este incremento de la protección a través de la vacuna está basado en mecanismos generales en todas las especies de camarón, haciendo del diseño de vacunas contra patógenos una opción viable para el cultivo de camarón (Witteveldt, 2006, Cap. 8).

III. JUSTIFICACIÓN

Recientemente ha llamado la atención el uso de esporas de *Bacillus subtilis* genéticamente modificadas en el desarrollo potencial de vacunas al expresar en su superficie antígenos fusionados a las proteínas de la cubierta de la spora. Debido a los graves problemas que provoca el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) sobre los organismos de cultivo a nivel mundial en gran medida a crustáceos como es el caso de *Litopenaeus vannamei*, se ha elegido a proteínas de su envoltura para usarlas como proteínas pasajero. En el presente trabajo se construirá una cepa de *B. subtilis* genéticamente modificada para desplegar proteínas intactas VP26 del WSSV fusionadas a proteínas CotC de la spora de la bacteria huésped.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar una cepa de *Bacillus subtilis* genéticamente modificada para desplegar sobre su espora proteínas de la cápside del Virus de la mancha Blanca (WSSV).

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Obtener oligonucleótidos específicos y amplificar los genes *cotB* y *cotC* de *Bacillus subtilis* y los genes *vp26* y *vp28* del Virus de la Mancha Blanca.
2. Fusionar en fase los genes *cotB* y *cotC* de *Bacillus subtilis* con los genes *vp26* y *vp28* del Virus de la Mancha Blanca.
3. Construir un Vector de Integración a partir de pDG1662 (plásmido integrativo para *B. subtilis*) y la fusión genética *cvp26*.
4. Integrar el Vector de integración pDGCVP26 en el locus del gene de amilasa del cromosoma de *B. subtilis*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

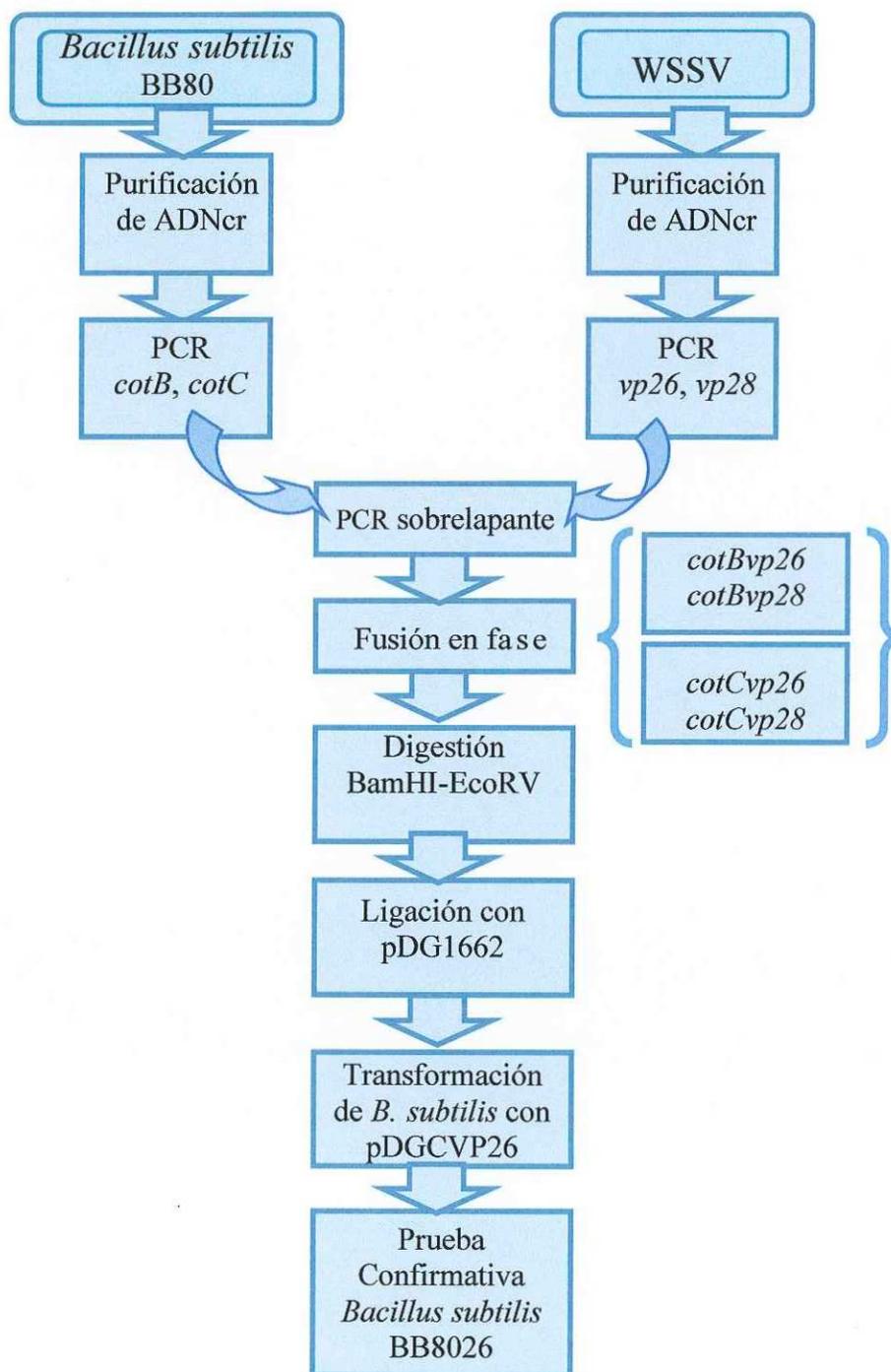


Figura 13. Esquema del protocolo experimental realizado para el desarrollo de esta investigación.

V.1 Material Biológico y Plásmidos.

En la tabla I se muestra el material biológico usado. Este fue almacenado a una temperatura de 4 °C en cajas Petri con medio sólido Luria Bertani (LB), (Sambrook, *et al.*, 1989). La cepa de *Bacillus subtilis* utilizada fue la BB80 *hys gly* y la DH5 α de *Escherichia coli* del Laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos Soto. Con lo que respecta al Virus de la Mancha Blanca (WSSV), fue proporcionado un volumen necesario de ADN viral por el Biol. Ricardo Valencia del Laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. Los camarones, de los que se extrajo el ADN viral, provienen de Sinaloa del laboratorio de producción de larvas Acuapacific, S.A. de C. V. Estos fueron infectados con tejido de organismos con el virus, recolectados en granjas de Sonora durante la epizootia de 1999 (Molina, *et al.*, 2007). La cepa del WSSV no ha sido completamente caracterizada, pero ya hay algunas secuencias que se han obtenido publicadas en Gen Bank.

En la tabla II se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo. Estos fueron clonados en la cepa *E. coli* DH5 α para su purificación y mantenimiento. Los plásmidos purificados se mantuvieron en estado deshidratado a -20 °C y resuspendidos en buffer TE a la misma temperatura. En la figura 14 se muestra una imagen de pDG1662 (6982 pb), plásmido integrativo en *B. subtilis*.

Tabla I. Material Biológico utilizado en el transcurso de este trabajo.

Especie	Cepa	Genotipo	Fuente
<i>B. subtilis</i>	BB80	<i>hys gly</i>	CICESE ¹
<i>B. subtilis</i>	BB8026	<i>hys gly</i> pDGCVP26	Este trabajo
<i>E. coli</i>	DH5 α	---	CICESE ¹
WSSV	---	---	UABC ²

¹Laboratorio de Microbiología Molecular. Depto. de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

²Laboratorio de Ecología Molecular. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.

Tabla II. Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmido	Genes	Tipo	Fuente
pDG1662	Sitio de recombinación <i>amy</i>	<i>Shuttle vector</i>	BGSC ¹
pDGCVP26	Sitio de recombinación <i>amy</i> , proteína CotB fusionada con proteína VP26.	<i>Shuttle vector</i>	Este trabajo

¹*Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio, USA.

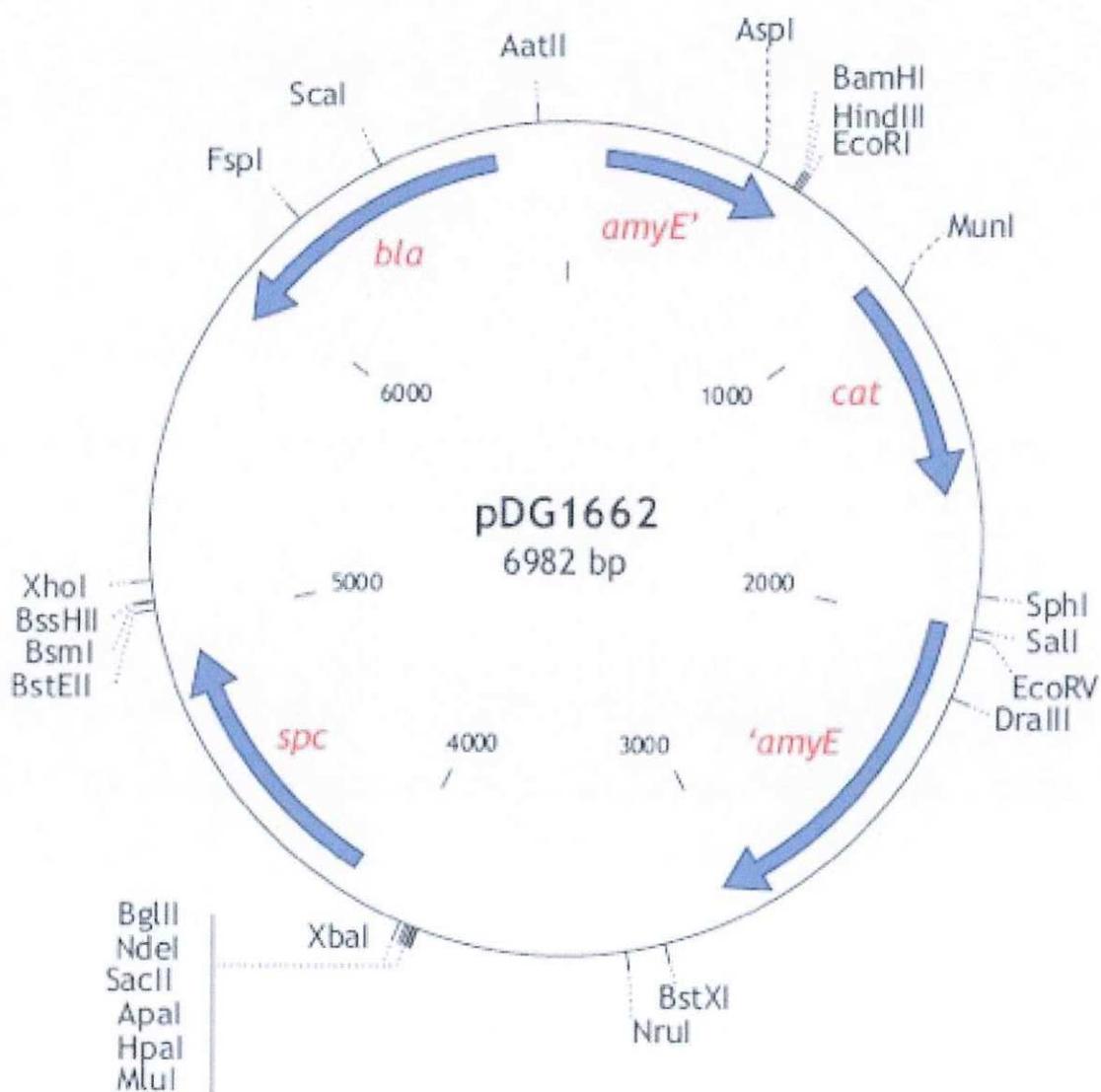


Figura 14. pDG1662, Plásmido usado como vector para integrar el fragmento fusión CVP26.

V.2 Tinción Gram y Curva de Crecimiento para *Bacillus Subtilis*.

Se realizó una tinción Gram a la cepa BB80 de *B. subtilis* y la muestra fue observada en un microscopio óptico marca Olympus BX60. El protocolo para la tinción Gram se describe a continuación.

- Protocolo para Tinción Gram:

1. Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica, esperar que enfríe un poco y tomar un poco de muestra sobre una lámina portaobjetos.
2. Extender la muestra mediante movimientos giratorios.
3. Secar al aire libre y fijar la muestra pasandola por la llama.
4. Cubrir por completo con crystal violeta. Se deja actuar por 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.
5. Enjuagar con agua. Esta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra.
6. Agregar lugol y esperar 1 minuto.
7. Enjuagar con agua
8. Agregar alcohol acetona y esperar 15 s (decoloración).
9. Enjuagar con agua y esperar que seque la lámina al aire libre.
10. Agregar safranina y esperar 1 min, éste tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
11. Enjuagar con agua y esperar que seque la lámina al aire libre.
12. Observar al microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.

Para la curva de crecimiento de *B. subtilis* se usó un agitador, marca Lab-line Incubator, para mantener en constante movimiento al cultivo con 250 rpm y a una temperatura fija de 37 °C. El medio de cultivo usado fue Luria Bertani (LB) líquido y medio de esporulación líquido Schaeffer. La densidad óptica (DO) de cada cultivo fue leída con un espectrofotómetro marca Hach DR 2800. El protocolo para la Curva de Crecimiento se describe a continuación.

- Protocolo para Curva de Crecimiento:
 1. Activación de la cepa. Sembrado en placa con medio LB por 12 horas a 37 °C.
 2. Cultivo. En un matraz estéril poner 20 ml de LB líquido e inocular una asada del cultivo de activación. Hacerlo por duplicado. Poner el cultivo en el orbital a 37 °C y 250 rpm por 12 horas (toda la noche).
 3. Medición de DO. Si la lectura pasa del valor 1 hacer una dilución 1:10, en 900 µl de H₂O y 100 µl de cultivo (o medio LB estéril para el blanco). Tomar lectura y multiplicar por 10. Elegir el cultivo que haya presentado mayor lectura.
 4. Preinóculo. Inocular 2 ml del del cultivo de toda la noche (el de mayor DO) en un matraz con 18 ml de medio Schaeffer, por duplicado. Poner el cultivo en el orbital a 37 °C y 250 rpm por 2 horas y medir DO. Si la lectura pasa del valor 1 se procede a la dilución. Elegir cultivo con DO más parecida a la DO teórica de *Bacillus subtilis* de ~ 0.5.
 5. Inóculo-Curva. Tomar 2 ml del preinóculo (cultivo elegido) e inocularlo en 18 ml de medio Schaeffer, por duplicado. Tomar lectura a las 2 horas de cultivo en agitación, hacer dilución. Medir lectura cada hora del cultivo hasta que exista una repetición de alrededor de 4 veces la lectura.

V.3 Diseño de Oligonucleótidos Específicos y Enzimas de Restricción.

En la tabla IV se muestran los oligonucleótidos específicos, diseñados en este trabajo, para la amplificación de los genes *cotB* y *cotC* de *B. subtilis* y los genes *vp26* y *vp28* del Virus de la Mancha Blanca. Para el diseño de oligos se utilizó el software Ape (*A plasmid Editor* v 1.10.4, Wayne Davis, 2005. University of California), tomando como base las secuencias genéticas obtenidas de BSORF (<http://bacillus.genome.jp/>), Subtilist (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) para *cotB* y *cotC*. Para los genes *vp26* y *vp28* del Virus de la Mancha blanca se consultó NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con No. de acceso DQ902657 para *vp26* y AF502435 para

vp28. Los oligos se mandaron a hacer al IDT (Integrated DNA Technologies) e Invitrogen. En la Tabla III se detallan las enzimas de restricción usadas en este trabajo, su secuencia y sitio de corte.

Tabla III. Enzimas de Restricción usadas en este trabajo.

ENZÍMA	SECUENCIA	SITIO DE CORTE
*BamHI	GGATCC	5' ... G/GATCC ... 3' 3' ... CCTAG/G ... 5'
*EcoRI	GAATTC	5' ... G/AATTC ... 3' 3' ... CTAA/G ... 5'
*EcoRV	GATATC	5' ... GAT/ATC ... 3' 3' ... CTA/TAG ... 5'

*Invitrogen

Tabla IV. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de fragmentos mediante la técnica de PCR. Las letras en rojo y subrayadas indican los sitios de corte enzimático o los sitios de hibridación para el PCR sobrelapante. L, longitud; nt, nucleótidos.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	L (nt)	Sitio de hibridación
BF BamHI	<u>Cg_{ggATCC}ACggATTAggCCgTTTgTC</u>	27	Región promotora de <i>cotB</i> (-263 nt).
BRVP28	<u>AAaArTrAAAaAAAaATCCAT</u> ggATgATTgATCATCTgAAgATTTTAgtg	50	Extremo 3' de <i>cotB</i> (825 nt).
BRVP26	<u>TrTTAagTTgCCAAATTCcAT</u> ggATgATTgATCATCTgAAgATTTTAgtg	50	Extremo 3' de <i>cotB</i> (825 nt).
CF BamHI	<u>Cg_{ggATCC}TgTAggATAAATCgTTTgggCC</u>	30	Región promotora de <i>cotC</i> (-23 nt).
CRVP28	<u>AAaArTrAAAaAAAaATCCAT</u> gTAgTgTTTTTATgCTTTTTATACTCTACAC	54	Extremo 3' de <i>cotC</i> (354 nt).
CRVP26	<u>TrTTAagTTgCCAAATTCcAT</u> gTAgTgTTTTTATgCTTTTTATACTCTACAC	54	Extremo 3' de <i>cotC</i> (354 nt).
VP26FB	<u>CTTCaArTeATCAATCATCC</u> ATggAATTTggCAACCTAACAAAC	44	Extremo 5' de <i>vp26</i> (1 nt).
VP26FC	<u>AAAAaCATAAAAAACACTAC</u> ATggAATTTggCAACCTAACAAAC	44	Extremo 5' de <i>vp26</i> (1 nt).
VP26R EcoRI	<u>Cg_{gAATTC}TTACTTCTTCTTgATTTCgTCCTTgA</u>	34	Extremo 3' de <i>vp26</i> (616 nt).
VP26R EcoRV	<u>gATATC</u> TTACTTCTTCTTgATTTCgTCCTTgA	32	Extremo 3' de <i>vp26</i> (616 nt).
VP28FB	<u>CTTCaArTeATCAATCATCC</u> ATggATCTTTCTTCACTCTTTCg	44	Extremo 5' de <i>vp28</i> (1 nt).
VP28FC	<u>AAAAaCATAAAAAACACTAC</u> ATggATCTTTCTTCACTCTTTCg	44	Extremo 5' de <i>vp28</i> (1 nt).
VP28R EcoRI	<u>Cg_{gAATTC}TTACTCggTCTCagTgCCA</u>	27	Extremo 3' de <i>vp28</i> (615 nt).

V.4 Extracción de ADN cromosomal de *B. subtilis*.

Para la extracción y purificación de ADNc de *B. subtilis* se uso el siguiente protocolo:

1. Crecimiento. Inocular 4 ml de medio LB con la cepa de interés. Crecer en condiciones apropiadas para esa cepa (antibiótico, temperatura, agitación, etc.), hasta que el cultivo llegue a fase estacionaria. Esto puede llevarse desde varias horas, hasta varios días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de las células. En este caso se utilizará un cultivo líquido saturado de *B. subtilis*.
(NOTA: el medio de cultivo, las condiciones apropiadas y el tiempo en que tarda en llegar a fase estacionaria van a variar de acuerdo a la especie de bacteria que se trabaje).
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo en una microcentrifuga a 12,000 r.p.m. durante 3 minutos hasta que se forme un pellet compacto. Eliminar el sobrenadante.
3. Lisis, extracción y precipitación del ADN. Resuspender el pellet en 567µl de buffer TE. Agregar 5 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubar a 37 °C, a los 10 min. agregar 10 µl de RNAasa (10 mg/ml), e incubar por 20 min. Adicionar 30 µl de SDS al 10 % (Dodecil Sulfato de Sodio) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para obtener una concentración final de 100 µg/ml de proteinasa K y de 0.5% de SDS (después de agregar el SDS, ya no se aplica vortex solo mezclado). Incubar 1 h a 37 °C, revolver cada 15 min. (Las concentraciones adicionales de lisozima pueden incrementarse, si no se observa lisis de las células en la concentración propuesta). NOTA: La solución debe tornarse translúcida.
4. Adicionar 100 µl de NaCl 5M y mezclar. NOTA: Este paso es muy importante, ya que se formará precipitado de ácido nucléico-CTAB, si la concentración de sal disminuye por debajo de 0.5 M a temperatura ambiente. El propósito es remover residuos de la pared celular, proteína desnaturalizada y polisacáridos con el CTAB, mientras el DNA cromosomal se mantiene soluble en el sobrenadante.
5. Agregar 80 µl de CTAB/NaCl. Mezclar e incubar 10 min. a 65 °C. (Tapar bien los tubos con papel parafilm y la tapa de seguridad).

6. Agregar 0.7 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar y centrifugar 5 min.
NOTA: Esta extracción remueve los complejos proteína-CTAB/polisacáridos. Una interfase blanca debe ser visible después de la centrifugación.
7. Transferir el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo nuevo de 1.5 ml para microcentrifuga, dejando atrás la interfase (si es muy gruesa la interfase, repetir el paso 6). Agregar un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), agitar y centrifugar 5 min.
8. Transferir el sobrenadante (600 μ l) a un tubo nuevo. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol (360 μ l) para precipitar los ácidos nucleicos (No hay necesidad de agregar sal, ya que la concentración de NaCl es alta). Agitar el tubo y centrifugar 10 min. Decantar el sobrenadante con cuidado y pegando el tubo a la pared de un recipiente.
9. Lavar con 1 ml de etanol al 70% y dar vortex. Centrifugar 5 min. y decantar el sobrenadante suavemente. Secar en el Vacufuge TM, 10 min, en fase alcohol, temperatura de 30 °C. Repetir este paso.
NOTA: Si no se forma ningún precipitado de ADN en el paso anterior, esto implica que el ADN se ha dividido en fragmentos relativamente pequeños y por lo tanto, hay que repetir todo el procedimiento.
10. Disolver el pellet en 100 μ l de buffer TE. Guardar a -20 °C. Verificar en gel de agarosa al 1.2% utilizando 5 μ l de DNA resuspendido. Si presenta un exceso de RNA, adicionarle nuevamente RNAasa e incubar a 37 °C por 20 min.
NOTA: Utilizar de 5 a 10 μ l para cada reacción de PCR y/o de Transformación.

Con lo que respecta a WSSV, no fue necesario extraer su ADN ya que éste fue donado por la UABC.

V.5 Amplificación de genes *cotB* y *cotC* de *B. subtilis* por PCR.

Para la amplificación de estos genes mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usaron los reactivos y volumen que se indican en la Tabla V. La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50 μ L. La polimerasa que se utilizó para estas reacciones fue la extraída en el Laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos Soto. La amplificación de la mezcla fue incubada en un termociclador (Bio-RAD iCycler) y el programa de amplificación se diseñó considerando el tamaño del templado a amplificar, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados y la polimerasa utilizada. En la Tabla VI y VII se muestran los ciclos, temperaturas y tiempos del programa de amplificación para los genes *cotB* y *cotC*, respectivamente. Para la amplificación de *cotB* se usaron los oligos: BF (Forward) que hibrida en la región promotora (-263 nt), agregándole en su extremo 5' un sitio de corte BamHI y el oligo BRVP26 (Reverse) que hibrida en la región 825 nt, agregándole en su extremo 5' un sitio de hibridación para *vp26* (primeros 21 nt de *vp26*) y el Oligo BRVP28 (Reverse) hibridando en la región 825 nt pero con un sitio de hibridación para *vp28* (primeros 21 nt de *vp28*). Para la amplificación de *cotC* se usaron los oligos: CF (Forward) que hibrida en la región promotora (-23 nt) agregándole en su extremo 5' un sitio de corte BamHI y el oligo CRVP26 (Reverse) que hibrida en la región 354 nt, adicionándole en su extremo 5' un sitio de hibridación para *vp26* (primeros 21 nt de *vp26*) y el Oligo CRVP28 (Reverse) hibridando en la misma región pero con un sitio de hibridación para *vp28* (primeros 21 nt de *vp28*).

V.6 Amplificación de genes *vp26* y *vp28* de WSSV por PCR.

En la Tabla VIII se muestran los ciclos, temperaturas y tiempos del programa de amplificación para los genes *vp26* y *vp28*. Para la amplificación de *vp26* se usaron los oligos: VP26FB (Forward) que hibrida en el extremo 5' del gen *vp26* agregándole en este extremo un sitio de hibridación con *cotB* (últimos 20 nt de *cotB*) y el oligo VP26FC (Forward) que hibrida en el extremo 5' de *vp26* adicionándole un sitio de hibridación con *cotC* (últimos 20 nt de *cotC*). Al oligo VP26R (Reverse) se le adicionó un sitio de corte EcoRV en su extremo 5', este oligo hibrida en el extremo 3' del gen *vp26*. Para la amplificación de

vp28 se usaron los oligos: VP28FB (*Forward*) que hibrida en el extremo 5' del gen *vp28* agregandole en su extremo 5' un sitio de hibridación con *cotB* (últimos 20 nt de *cotB*) y el oligo VP28FC (*Forward*) que hibrida en el extremo 5' de *vp28* agregandole en su extremo 5' un sitio de hibridación con *cotC* (últimos 20 nt de *cotC*). El oligo VP28R (*Reverse*) que hibrida en el extremo 3' de *vp28* se le adicionó un sitio de corte EcoRI en su extremo 5'. Cada fragmento amplificado se purificó con la técnica fenol-cloroformo.

Tabla V. Reacción de PCR.

REACTIVOS	VOLUMEN
dNTP's 10 mM	1.0 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µl
Buffer 10 X	5.0 µl
H ₂ O _{dd}	37.5 µl
Taq ADN polimerasa (1 U/µl)	1.0 µl
ADN molde (50 ng/µl)	2.0 µl
Oligo 5' (0.2 µg/µl)	1.0 µl
Oligo 3' (0.2 µg/µl)	1.0 µl
VOLUMEN FINAL	50.0 µl

Tabla VI. Programa para amplificación de *cotB*.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
(1X)	95 °C	5'
(25X)	95 °C	1'
	52, 50 °C	1'
	72 °C	2'
(1X)	72 °C	10'
(1X)	4 °C	∞

Tabla VII. Programa para amplificación de *cotC*.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
(1X)	95 °C	5'
(25X)	95 °C	1'
	56 °C	1'
	72 °C	2'
(1X)	72 °C	10'
(1X)	4 °C	∞

NOTA: La Temperatura de hibridación puede variar dependiendo de los oligonucleótidos usados.

Tabla VIII. Programa para amplificación de *vp26* y *vp28*.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
(1X)	95 °C	5'
(25X)	95 °C	1'
	52 °C	1'
	72 °C	2'
(1X)	72 °C	10'
(1X)	4 °C	∞

V.7 PCR Sobrelapante.

Se realizó un PCR sobrelapante para fusionar los genes amplificados *cotC* con *vp26* y obtener un fragmento denominado CVP26 para su posterior amplificación. Este PCR consta de 2 etapas, en la primera no se adicionan oligonucleótidos a la mezcla y la reacción se lleva a un volumen final de 50 μ l. En este primer paso se espera fusionar a *cotC* y *vp26*. Los reactivos y el volumen empleado se muestran en la Tabla IX. En la Tabla X se muestran los ciclos, temperaturas y tiempos del programa de fusión para los genes *cotC* y *vp26* incubados en un termocicador (Bio-RAD iCicler).

Tabla IX. Reacción de PCR 1er. Etapa.

REACTIVOS	VOLUMEN
dNTP's 10 mM	1.0 μ l
MgCl ₂ 50 mM	1.5 μ l
Buffer 10 X	5.0 μ l
H ₂ O _{dd}	37.5 μ l
Taq ADN polimerasa (1 U/ μ l)	1.0 μ l
Fragmento CotC	2.0 μ l
Fragmento VP26	2.0 μ l
VOLUMEN FINAL	50.0 μl

Tabla X. Programa para fusión de *cotC* y *vp26*.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
(1X)	95 °C	5'
(13X)	95 °C	1'
	60 °C	1'
	72 °C	2'
(1X)	72 °C	10'
(1X)	4 °C	∞

En la 2da. etapa de la reacción se adicionó 1.0 μ l del Oligo CF y 1.0 μ l del Oligo VP26R_{EcoRV} a la mezcla inicial. En este segundo paso se espera amplificar el fragmento CVP26. En la Tabla XI se muestran los ciclos, temperaturas y tiempos del 2do. programa para la amplificación de la fusión. CVP26 posee teóricamente en su extremo 5' un sitio de corte para BamHI y en su extremo 3' un sitio de corte EcoRV. Estos sitios de corte se usaron para clonar este fragmento en el plásmido pDG1662.

Tabla XI. Programa para amplificación del fragmento CVP26.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
(1X)	95 °C	5'
(13X)	95 °C	1'
	53 °C	1'
	72 °C	3'
(1X)	72 °C	10'
(1X)	4 °C	∞

V. 8 Electroforesis.

Para apreciar la fragmentación del DNA, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en buffer TBE 1X, a un voltaje constante de 75 V. En cada pozo del gel se cargaron 5.0 μ l de la muestra de DNA más 2.0 μ l de colorante para DNA 10X*. Una vez corrida la muestra, ~30 min., se procedió a la tinción del gel con un baño de bromuro de etidio y se enjuagó con agua destilada. Después se continuó con la corrida de la muestra en la cámara de electroforesis por ~30 min. más. Posteriormente el gel se observó en la cámara con lámpara de luz UV y se tomó registro del patrón de bandeo mediante una fotografía. Se procuró que la integración de la imagen fuera cero para la mayoría de las fotografías capturadas. El marcador molecular usado fue 100 pb DNA ladder por Invitrogen a una concentración de 0.1 μ g/ μ l.

* Colorante para DNA 10X: 0.25% de azul de bromofenol
0.25% de xilencianol
30% de glycerol en H₂O_{dd}

V.9 Construcción del plásmido pDGCVP26 a partir de pDG1662 y CVP26.

pDG1662, es un plásmido que presenta las siguientes características: tiene origen de replicación para *E. coli*; es un plásmido suicida para *B. subtilis*, es decir, no presenta origen de replicación para esta bacteria pero favorece su integración en el genoma de *B. subtilis*; cuenta con dos regiones del gen *amy* (*amyE'* y '*amyE*') para llevar a cabo una recombinación homóloga doble en el gene 168 α -amilasa de *B. subtilis* e incluye a los genes *bla* y *spc*, que codifican para las enzimas β -lactamasa y espectinomicina adeniltransferasa responsables de la resistencia a ampicilina y espectinomicina, respectivamente, Fig. 14 (Guérout-Fleury, 1996).

CVP26, es el fragmento obtenido producto de la fusión en fase del gene *cotC* de *B. subtilis* con el gene *vp26* del WSSV. Se incluyen dos sitios de corte, uno para la enzima BamHI en su extremo 5' y el otro para la enzima EcoRV en su extremo 3' (fig. 15) a fin de poder clonar el gene *cvp26* en el vector de integración pDG1662 en los sitios de

recombinación del gene *amy*.

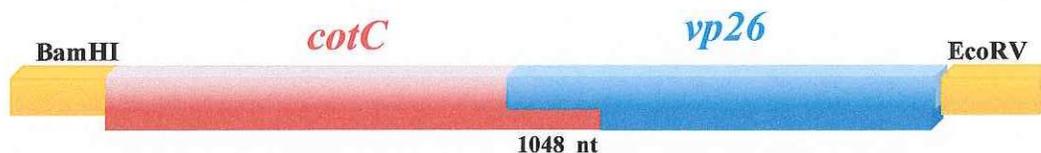


Figura 15. Fragmento CVP26 (clonado en pDG1662).

V.9.1 Digestión del plásmido pDG1662 y fragmento CVP26.

La digestión del plásmido pDG1662 y del fragmento CVP26 se llevó a cabo con las enzimas de restricción BamHI y EcoRV. Esto con la finalidad de obtener un fragmento que posea secuencias adhesivas únicas en cada extremo y así evitar el autoligado del fragmento. La reacción se llevó a cabo como se muestra en la Tabla XII.

Tabla XII. Reacción de Digestión.

REACTIVO	VOLUMEN
ADN (50 ng/ μ l)	20.0 μ l
*Buffer No. 3 10 X	10.0 μ l
*BamHI (10 U/ μ l)	5.0 μ l
*EcoRV (10 U/ μ l)	5.0 μ l
H ₂ O _{dd}	60.0 μ l
VOLUMEN FINAL	100.0 μ l

*Invitrogen

Cada reacción se realizó en tubo eppendorf de 300 μ l sobre hielo y se incubaron en el termociclador con el siguiente programa: (3X) 37°C 60'

(1X) 65°C 10'

4°C ∞

Las muestras fueron agitadas en un vortex y se almacenaron a - 20 °C hasta su uso. Las reacciones fueron corridas en gel de agarosa al 1.2% para verificar el buen funcionamiento de las enzimas de digestión.

V.9.2 Purificación por el método fenol – cloroformo.

Una vez comprobado el buen funcionamiento de las enzimas de digestión sobre el vector pDG1662 y sobre el fragmento de inserto CVP26, se purificaron los segmentos de interés por el método fenol-cloroformo para obtener la mayor pureza de ADN posible, ya que este es un factor de suma importancia en la ligación. Los pasos para la purificación se detallan a continuación:

1. Se agrega 100 µl de fenol frío al tubo donde se realizó la digestión. Se aplica vortex.
2. Se agregan 100 µl de cloroformo y se aplica vortex.
3. Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm.
4. Se transfiere fase acuosa o sobrenadante a tubo nuevo (100 µl).
5. Se agregan 1/25 volúmenes de NaCl 5 M, agitar muy bien.
6. Se agregan 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se agita la mezcla suavemente.
7. Precipitar el contenido colocando los tubos sobre hielo seco e incubar en hielo seco por 1 hora o a -70 °C toda la noche.
8. Se centrifuga 15 minutos a 14000 rpm y se decanta el sobrenadante.
9. Se agrega 1 ml de etanol frío al 70%, y se aplica vortex.
10. Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm.
11. Se decanta y se deja secar 15 minutos sobre papel absorbente.
12. Se resuspende el ADN en 40 µl de H₂O dd estéril.

Finalmente se cargan 5 ml de la muestra purificada en gel de agarosa al 1.2% y se corre en cámara de electroforesis 40 minutos a 75 volts para verificar la pureza del ADN recuperado.

V.9.3 Ligación del plásmido pDG1662 e inserto CVP26.

Después de verificar la pureza del ADN digerido se prosiguió con la ligación del vector y el inserto. La reacción se detalla en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Reacción de Ligación.

REACTIVO	VOLUMEN
Vector pDG1662	3.0 μ l
Inserto CVP26	9.0 μ l
*Buffer 5X	4.0 μ l
H ₂ O _{dd}	2.0 μ l
*T4 DNA Ligasa (1 U/ μ l)	2.0 μ l
VOLUMEN FINAL	20.0 μ l

*Invitrogen

La proporción en cuanto a la cantidad de ADN del vector respecto al ADN del inserto fue de 1:3. La mezcla se realizó en tubo eppendorf de 300 ml sobre hielo, se agregaron los primeros 4 reactivos y se espero 5 minutos para agregar la ligasa T4. Finalmente se mezcló con delicadeza y se incubo en el termociclador a:

(5X) 26 °C 60' (ACTIVACIÓN)

(1X) 65 °C 10' (INACTIVACIÓN)

4 °C ∞ (PRESERVACIÓN)

El plásmido resultante de la ligación se nombró pDGCVP26 (fig. 27). Las muestras se almacenaron a - 20 °C hasta su uso en la transformación de *E. coli*.

V.10 Transformación de *E. coli* DH5 α con pDGCVP26.

Para multiplicar las copias del plásmido pDGCVP26, obtenido mediante la ligación del fragmento CVP26 en el plásmido pDG1662, se usó la cepa de *E. coli* DH5 α . El procedimiento para la transformación fue el siguiente:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril (sobre hielo) colocar 50 μ l de las células competentes de *E. coli* DH5 α y agregar 10 μ l de pDGCVP26.
2. Incubar en hielo por 1 h, con agitación ligera cada 15 minutos.
3. Colocar en baño maría a 37 °C por 5 minutos (*shock* térmico).
4. Colocar en hielo por 1 minuto.
5. Transferir la reacción a un tubo de ensaye estéril con 500 μ l de medio LB, incubar a 37 °C, 250 rpm, por 45 minutos.
6. Al terminar el tiempo, plaquear 200 μ l (con ~6 perlitas estériles) en cajas con LB-Ap⁵⁰. Incubar las placas a 37 °C de 24 a 36 horas.

Al terminar el tiempo de incubación (día siguiente) en las placas de LB-Ap⁵⁰ se pudieron observar pequeñas colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina. Estas colonias se sembraron en LB-Ap⁵⁰ y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

V.11 Purificación de ADN plasmídico.

Se purificó el plásmido pDGCVP26 de las colonias de *E. coli* transformadas (que mostraron resistencia a la ampicilina). El procedimiento fue el siguiente:

1. Inocular 3 ml de medio LB líquido con las células transformadas con el vector de interés (plásmido) y crecer hasta fase estacionaria ~ de 6-8 horas.
2. Transferir 1 ml del cultivo a tubos de eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 1 minuto a 12,000 rpm.

3. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 1 ml de buffer SET. Revolver co cuidado.
4. Centrifugar las células por 1 minuto, desechar sobrenadante y resuspender en 150 μ l de buffer SET. Agregar 5 μ l de lisozima e incubar a 37 °C por 10 minutos.
5. Agregar 5 μ l de buffer de RNAasa y agitar. Adicionar 350 μ l de mezcla lítica y mezclar.
6. Incubar 10 minutos en baño de hielo.
7. Agregar 250 μ l de buffer de acetato de sodio e invertir el tubo varias veces. Incubar en hielo por 30 minutos. En este paso precipitará el SDS y el DNA cromosomal desnaturalizado.
8. Centrifugar la solución a temperatura ambiente durante 8 minutos y transferir 700 μ l del sobrenadante a un tubo de 1.5 ml limpio.
9. Adicionar un volúmen equivalente de isopropanol, invertir los tubos varias veces y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos de manera invertida en papel absorbente limpio durante 5 minutos.
10. Lavar el pellet de DNA adicionando 1 ml de etanol al 70%. Dar vortex. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. Desechar el etanol y colocar los tubos de nuevo sobre el papel absorbente durante 15 minutos. Resuspender en 40 μ l de buffer TE.
11. Verificar el contenido y pureza de ADN en gel de agarosa al 1.2% utilizando 5 μ l de DNA resuspendido.

El plásmido recuperado se puede mantener a -20 °C hasta su uso, o bien, mantenerse deshidratado en congelación por tiempo indefinido.

V.12 Transformación de *B. subtilis*.

La transformación se puede definir como la variación hereditaria de una célula bacteriana susceptible, originada por la captación de ADN desnudo libre en el medio, con la posterior recombinación del exogenote (ADN recién entrado) con el genomio de la célula en cuestión (endogenote). Tras la transformación, la célula que ha recibido el ADN se suele denominar transformante.

La transformación de *B. subtilis* con ADN foráneo se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Estriar las colonias de interés en cajas petri con medio LB e incubar toda la noche a 37°C.
2. Al siguiente día por la mañana resuspender una asada de células al siguiente caldo nutritivo:

Sales de Bacillus 10X	250.0 µl
Glucosa al 20%	62.5 µl
MgSO ₄ 1M	12.5 µl
Casaaminoácidos al 20%	2.5 µl
Triptófano 10mg/ml (y otras auxotrofias)	31.2 µl
H ₂ O destilada desionizada (dd)	2141.0 µl

3. Agitar a 250 rpm y 37° C por 5 horas o hasta que se obtenga un movimiento flagelar muy fuerte verificando en el microscopio.
4. Hacer un segundo medio de dilución que contenga los siguientes ingredientes:

Sales de Bacillus 10X	250.00 µl
Glucosa al 20%	62.50 µl
MgSO ₄ 1M	12.50 µl
Casaaminoácidos al 20%	1.25 µl
Triptófano 10mg/ml (y otras auxotrofias)	3.10 µl
H ₂ O destilada desionizada (dd)	2170.00 µl

5. Hacer una dilución 1:10 del cultivo crecido 5 horas con el segundo medio de dilución [0.25 ml (cultivo) en 2.25 ml (sol. 2)], mezclar. Adicionar a 2 tubos de ensayo 1ml de la dilución, y sólo a un tubo (problema) adicionar 10 µl del ADN con el cual se desea transformar a *Bacillus* y al otro tubo (control) no se le adiciona nada.
6. Colocar los tubos de nuevo en el orbital a 37° C e incubar por 1.5 horas.

7. Preparar cajas selectivas con la auxotrofia y/o resistencia (antibiótico) que se transfirió con el ADN con el cual se transformó. Sembrar 100 μ l del cultivo transformado e incubar a 37° C por 24 h.

V.13 Actividad α -amilasa extracelular de *B. subtilis*.

Las colonias de *B. subtilis* transformadas con el plásmido pDGCVP26 no presentan resistencia a antibióticos. Las clonas que integraron a pDGCVP26, deben ser incapaces de degradar almidón del medio, por la inactivación del gene *amy* responsable de la producción de amilasas. Por lo que la selección de las colonias fue a partir de aquellas que no presentaron un halo de degradación del almidón y al reaccionar con Yodo da un patrón de coloración obscuro.

Se prepararon cajas con LB adicionado con 0.5% de almidón y se sembró 100 μ l del cultivo transformado (BB80 *hys*, *gly* con pDGCVP26). Se hicieron diluciones ya que el medio de cultivo no incluía antibiótico. Se tomó la caja de cultivo con dilución 1×10^{-5} y se eligieron 50 colonias que se resembraron en LB sólido y LB-0.5% almidón. Después de 12 horas de cultivo se seleccionó de las colonias crecidas en LB con 0.5% de almidón aquellas que no presentaban un halo de degradación del almidón. Se usó la técnica de actividad de α -amilasa extracelular de *B. subtilis*. Esta se describe a continuación:

1. Preparar cajas LB-almidón.
2. Incubar por 12 horas a 37 °C.
3. Al día sig. abrir la caja y colocar gránulos de Yodo en la tapa.
4. Cerrar la caja, manteniendo la tapa hacia abajo.
5. Colocar la caja sobre una parilla a 37 °C (o más) hasta que los vapores de Iodo pinten de azul todo el medio de cultivo. La formación de halos está dada por la degradación del almidón alrededor de las colonias por la acción de las α -amilasas y se observan translúcidos.

6. Medir el halo formado en mm.

Se realizó una prueba de confirmación a partir de PCR, para ello se purificó ADNcr (V.4 Extracción de ADN cromosomal de *B. subtilis*, pag. 29) de cada colonia seleccionada para amplificar el inserto CVP26 usando los oligos CF y VP26R_{EcoRV}.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1 Material Biológico.

En la fig. 16 se muestra un gel de agarosa con muestras de ADN cromosomal (ADNcr) de *B. subtilis* cepa BB80 *hys gly*. Como se observa, las condiciones de extracción y purificación de ADNcr fueron viables para la amplificación de los genes *cotB* y *cotC* de *B. subtilis*. El patrón de bandeo corresponde a un DNACr de un tamaño de 4,214,810 pb (Kunst, *et al.*, 1997). Para la amplificación de los genes *vp26* y *vp28* del Virus de la Mancha Blanca, se usó DNA, donado por la UABC por el Biol. Ricardo Valencia, de un tamaño de 305,107 pb (Yang, *et al.*, 2001).



Figura 16. Electroforesis de ADN cromosomal de *B. subtilis* cepa BB80 *hys gly*.

VI.2 Tinción Gram y Curva de Crecimiento para *Bacillus Subtilis*.

En la fig. 17 se muestra una tinción Gram de *B. subtilis* y a partir del patrón de coloración obtenido se indica que es una bacteria Gram positiva (Barák, *et al.*, 2005). Los fundamentos de la técnica de tinción se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. La clave es el peptidoglicano, ya que es el material que confiere rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas. La pared celular de las bacterias Gram

positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico (alcohol-cetona), sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

Puede darse el caso de que los microorganismos grampositivos como *Bacillus subtilis* y *B. anthracis* tomen negativamente el Gram cuando los cultivos datan de dos a tres horas. Luego se desarrolla la sustancia grampositiva debajo de la pared celular, para invertir la reacción.

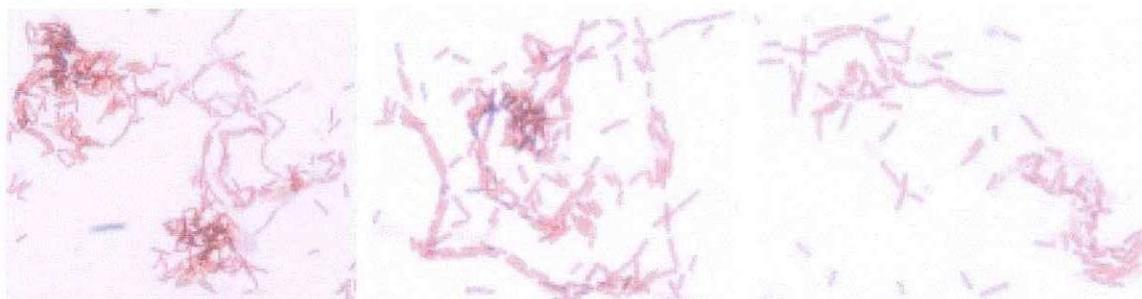


Figura 17. Tinción Gram de *Bacillus subtilis*. Escala 100X.

Se realizó una curva de crecimiento de *B. subtilis*, para su cultivo se usó medio LB líquido y medio de esporulación de Schaeffer a una temperatura de 37 °C y en agitación constante a 250 rpm. En la fig. 18, se observa la fase exponencial de crecimiento de las bacterias donde se dividen hasta el nivel máximo posible y la velocidad de crecimiento es constante, se muestra que esta fase se presenta de las 0 a las 3 horas tiempo de lectura. La fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento neta es cero y la población bacteriana alcanza su número máximo, se presentó de las 3 a las 5 horas tiempo de lectura. Posteriormente se observa un declive en el gráfico esto se debe a una cantidad constante de células que mueren en intervalos regulares de tiempo conocida como fase de muerte, esta se presentó de las 6 a las 9 horas de lectura. La cinética de crecimiento fue muy parecida a la reportada por Colombo en el 2000 para esta especie.

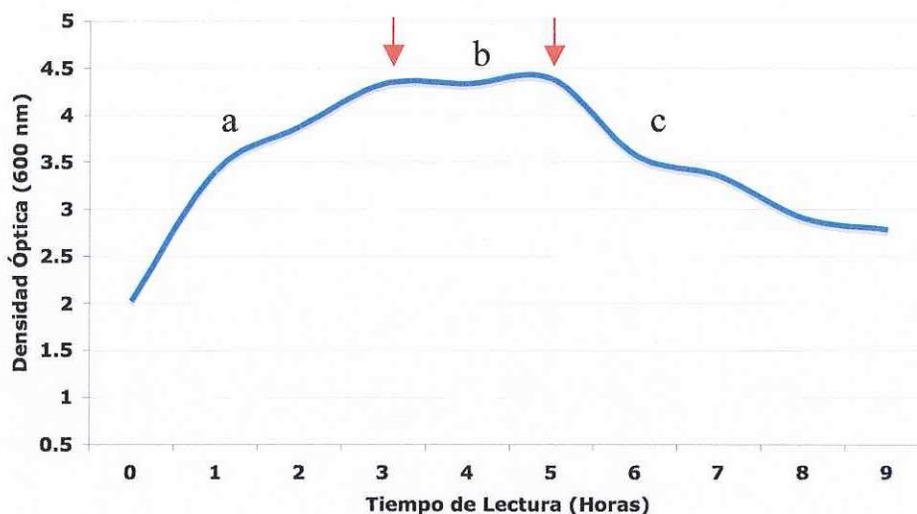


Figura 18. Gráfico de la Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis*. (a) Fase exponencial, (b) Fase estacionaria, (c) Fase de muerte celular. Se registró la absorbancia a 600 nm por un espacio de 9 h.

VI.3 Diseño de Oligonucleótidos Específicos y Enzimas de Restricción.

Los oligonucleótidos diseñados tienen una longitud entre 27 y 54 nucleótidos. Su temperatura melting (T_m) o de fusión es de 55 y 56 °C. En la tabla XV, se muestra que la T_m de los oligos que hibridan en *cotB* y *cotC* es de 56°C, se subraya los sitios de corte en la secuencia o bien el sitio de hibridación para el solapamiento de los genes, se especifica la enzima o la secuencia del gen con la que hibrida el oligo diseñado según sea el caso y su posición de alineamiento con respecto al sitio de inicio de la transcripción en *cotB* y *cotC*. Se presenta la misma información para los oligos que hibridan en *vp26* y *vp28*, indicando con un * aquellos que mantienen una T_m de 55 °C. Todos los oligonucleótidos diseñados pudieron amplificar los fragmentos en los tamaños esperados, se observaron bandas claramente visibles con la tinción de Bromuro de Etidio bajo luz UV. Una vez estandarizado el programa de amplificación para cada fragmento, la temperatura de hibridación (la programada en el termociclador) presentó variaciones oscilando entre 50 a

56 °C como se observa en la tabla XIV, realizándose las modificaciones pertinentes. Confirmando lo ya propuesto por Innis y Gelfand en 1994, que es común utilizar temperaturas de hibridación 5 °C por debajo de la temperatura de fusión del par de oligos diseñados. Se procuró que cada par de oligos diseñados tuvieran temperaturas de fusión similares y en un rango de 55 a 72 °C, también se consideró la presencia de residuos G o C en el extremo 3' de cada oligo a fin de asegurar que el extremo 3' hibride correctamente debido a los enlaces de hidrógeno que se dan entre los residuos G=C (Grande, 2004).

Tabla XIV. Temperaturas de hibridación para cada fragmento amplificado.

Fragmento	Hibrida con	Tm °C
CotB	VP26	52
	VP28	50
CotC	VP26	56
	VP28	56
VP26	CotB	52
	CotC	52
VP28	CotB	52
	CotC	52

Tabla XV. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *cotB*, *cotC* y *vp26*, *vp28* mostrando su Temperatura de fusión, Secuencia, Enzima de restricción y Posición de alineamiento con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT).

OLIGOS T _m = 56°C	Secuencia 5' → 3'	Enzima de Restricción o secuencia de hibridación	Posición de alineamiento en <i>cotB</i> y <i>cotC</i>
BF	Cg _{gc} ATCCACggATTAggCCgTTTgTC	BamHI	- 263/-244
BRVP26	TcTTA _{gc} TTgC _{gc} AAATTC _{gc} ATggATgATTgATCATCTgAAgATTTTAgTg	1eros. 20 nt de <i>vp26</i>	825/796
BRVP28	AA _{gc} AT _{gc} TA _{gc} AA _{gc} AA _{gc} ATCC _{gc} ATggATgATTgATCATCTgAAgATTTTAgTg	<i>vp28</i>	825/796
CF	Cg _{gc} ATCC TgTAggATAAATCg'TTTgggCC	BamHI	- 23/-2
CRVP26	TcTTA _{gc} TTgC _{gc} AAATTC _{gc} ATgTAgTgTTTTTATgCTTTTTATACTCTACAAC	<i>vp26</i>	354/321
CRVP28	AA _{gc} AT _{gc} TA _{gc} AA _{gc} AA _{gc} ATCC _{gc} ATgTAgTgTTTTTATgCTTTTTATACTCTACAAC	<i>vp28</i>	354/321
OLIGOS T _m = *55, 56°C	Secuencia 5' → 3'	Enzima de Restricción o secuencia de hibridación	Posición de alineamiento en <i>vp26</i> y <i>vp28</i>
VP26FB	CTTC _{gc} AT _{gc} TA _{gc} CAATCATCCATggAATTTggCAACCTAACAAAC	<i>cotB</i>	1/24
VP26FC	AAAA _{gc} CATAAAAA _{gc} CACTACATggAATTTggCAACCTAACAAAC	<i>cotC</i>	1/24
*VP26R	Cg _{gc} AAATTC TTACTTCTTCTTgATTTTCgTCCTTgA	EcoRI	616/592
*VP26R	gATATC TTACTTCTTCTTgATTTTCgTCCTTgA	EcoRV	616/592
*VP28FB	CTTC _{gc} AT _{gc} TA _{gc} CAATCATCCATggATCTTTCTTTCACTCTTTCg	<i>cotB</i>	1/24
*VP28FC	AAAA _{gc} CATAAAAA _{gc} CACTACATggATCTTTCTTTCACTCTTTCg	<i>cotC</i>	1/24
VP28R	Cg _{gc} AAATTC TTACTCggTCTCagTgCCA	EcoRI	615/596

VI.4 Amplificación de genes *cot* de *B. subtilis* por medio de la técnica de PCR.

VI.4.1 Amplificación del gene *cotB*.

En la fig. 19a se observa una representación esquemática de la amplificación del gene *cotB* por el oligo BF que hibrida en la posición 5' del gene *cotB* y el oligo BRVP26 o BRVP28 que hibrida en la región 3'. La barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI (8 pb), la barra rosa representa al gene *cotB* incluyendo su región promotora y codón de inicio (1088 pb). La barra azul representa a los primeros 21 nucleótidos del gene *vp26* o barra verde para el gene *vp28* del Virus de la Mancha Blanca, para su posterior sobrelapamiento.

En la fig. 19b se muestra la amplificación del gene *cotB* por medio de la técnica de PCR, revelada en gel de agarosa. Los resultados observados se mantienen acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 1,117 pb.

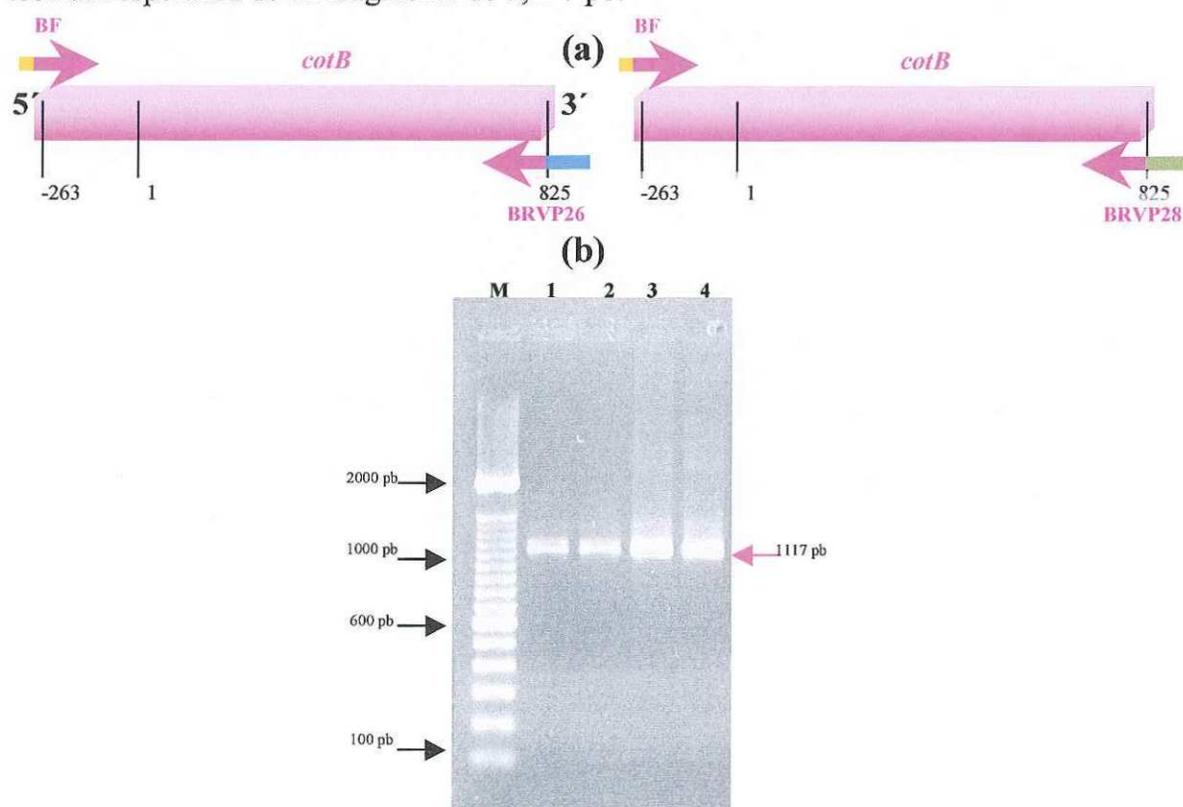


Figura 19. (a) Diseño teórico de fragmentos amplificados CotB. (b) Electroforesis. Se observan bandas de amplificación del gen *cotB* con secuencias 3' para fusión con *vp26* (1, 2) o *vp28* (3, 4). El fragmento esperado de 1117 pb se indica con un marcador de peso molecular (M) 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, invitrogen.

VI.4.2 Amplificación del gene *cotC*.

En la fig. 20a se observa una representación esquemática de la amplificación del gene *cotC* por el oligo CF que hibrida en la posición 5' del gene *cotC* y el oligo CRVP26 o CRVP28 que hibrida en su región 3'. La barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI (8 pb), la barra roja representa al gene *cotC* incluyendo su región promotora y codón de inicio (377 pb). La barra azul representa a los primeros 21 nucleótidos del gene *vp26* o barra verde para el gene *vp28* del Virus de la Mancha Blanca, para su posterior sobrelapamiento.

En la fig. 20b se muestra la amplificación del gene *cotC* por medio de la técnica de PCR, revelada en gel de agarosa. Los resultados observados se mantienen acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 406 pb.

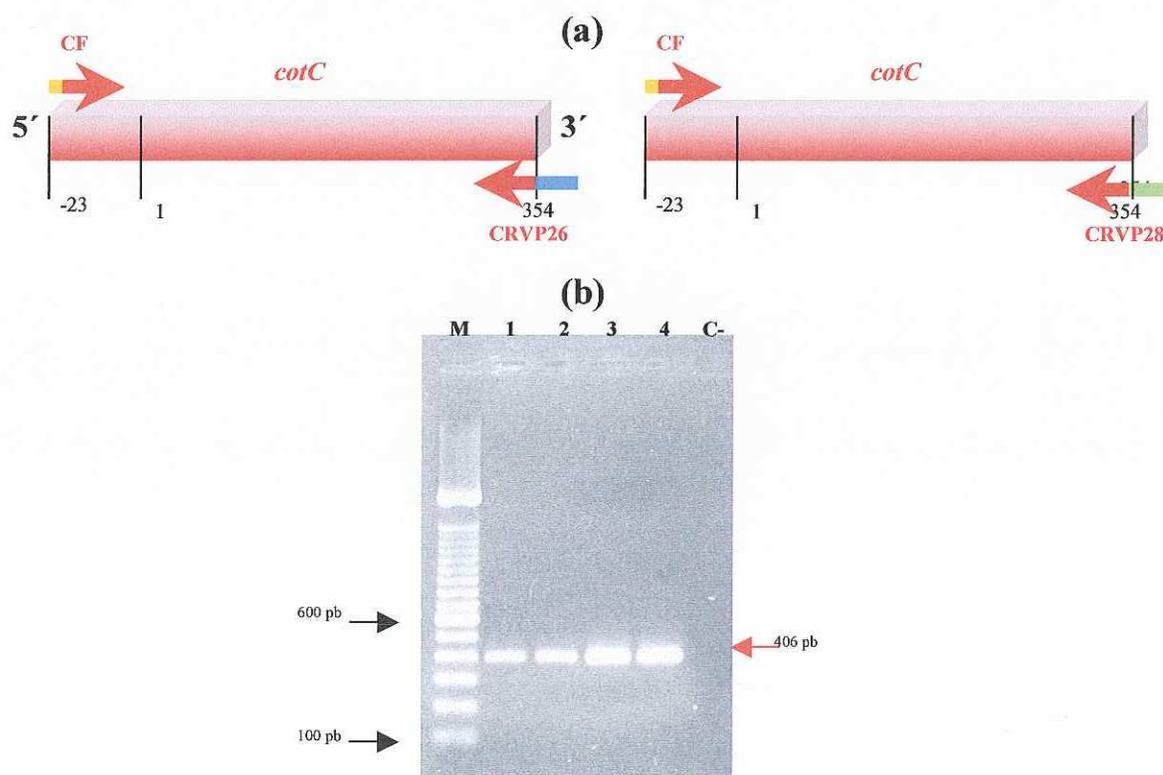


Figura 20. (a) Diseño teórico de fragmentos amplificados *CotC*. (b) Electroforesis. Se observan bandas de amplificación del gen *cotC* con secuencias 3' para fusión con *vp26* (1, 2) o *vp28* (3, 4). El fragmento esperado de 406 pb se indica con el marcador de peso molecular (M). Se muestra un control negativo de la amplificación (C-).

VI.5 Amplificación de genes *vp* del Virus de la Mancha Blanca.

VI.5.1 Amplificación del gene *vp26*.

En la fig. 21a se observa una representación esquemática de la amplificación del gene *vp26* por el oligo VP26FB o VP26FC que hibrida en la posición 5' del gene *vp26* y el oligo VP26R que hibrida en la region 3'. La barra rosa representa a los primeros 20 nucleótidos del gene *cotB* o barra roja en representación del gene *cotC* de *B. subtilis*, para su posterior sobrelapamiento. La barra azul representa al gene *vp26* (616 pb) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRI (8 pb) o EcoRV (6 pb).

En la fig. 21b se muestra la amplificación del gene *vp26* por medio de la técnica de PCR, revelada en gel de agarosa. Los resultados observados se mantienen acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 644 pb y 642 pb.

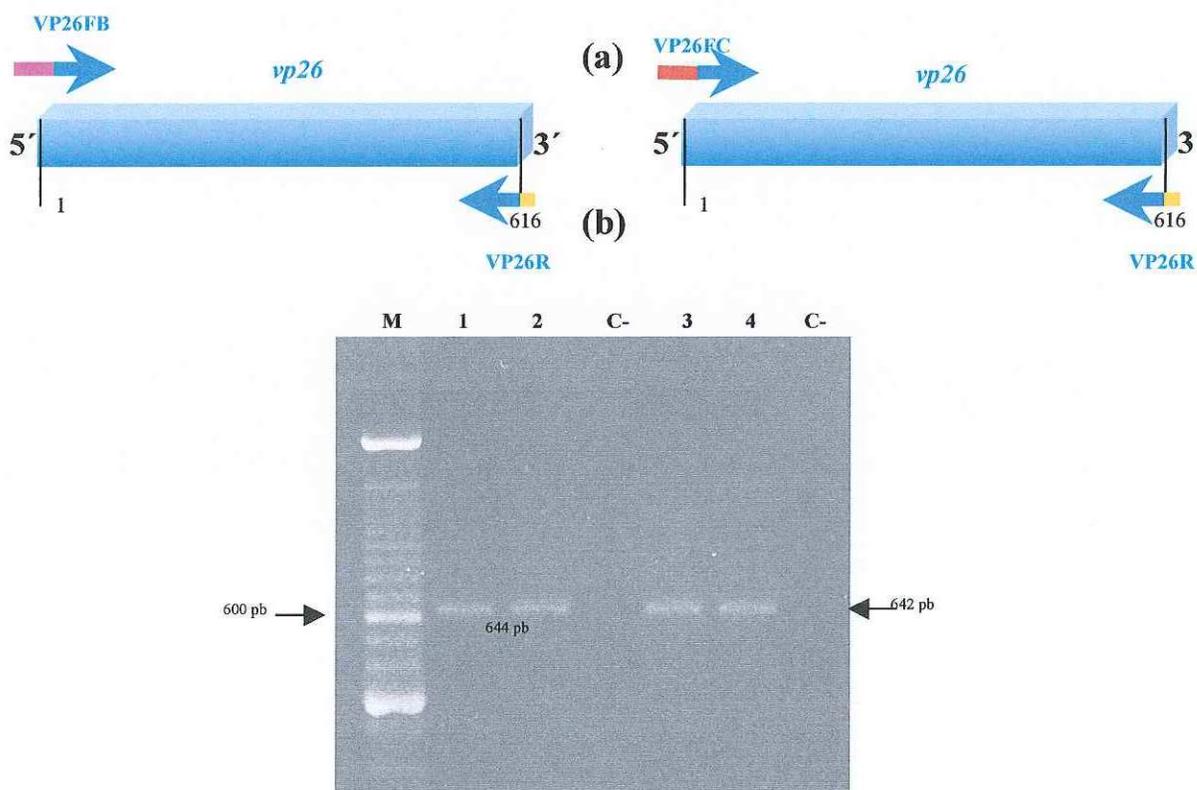


Figura 21. (a) Diseño teórico de fragmentos amplificados VP26. (b) Electroforesis. Se observan bandas de amplificación del gen *vp26* con secuencias 5' para fusionarse con *cotB* (1, 2) de un tamaño esperado de 644 pb y con secuencias 5' para fusionarse con *cotC* (3, 4) de 642 pb.

VI.5.2 Amplificación del gene *vp28*.

En la fig. 22a se observa una representación esquemática de la amplificación del gene *vp28* por el oligo VP28FB o VP28FC que hibrida en la posición 5' del gene *vp28* y el oligo VP28R que hibrida en la región 3'. La barra rosa representa a los primeros 20 nucleótidos del gene *cotB* o barra roja en representación del gene *cotC* de *B. subtilis*, para su posterior sobrelapamiento. La barra verde representa al gene *vp28* (615 pb) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRI (8 pb).

En la fig. 22b se muestra la amplificación del gene *vp28* por medio de la técnica de PCR, revelada en gel de agarosa. Los resultados observados se mantienen acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 643 pb.

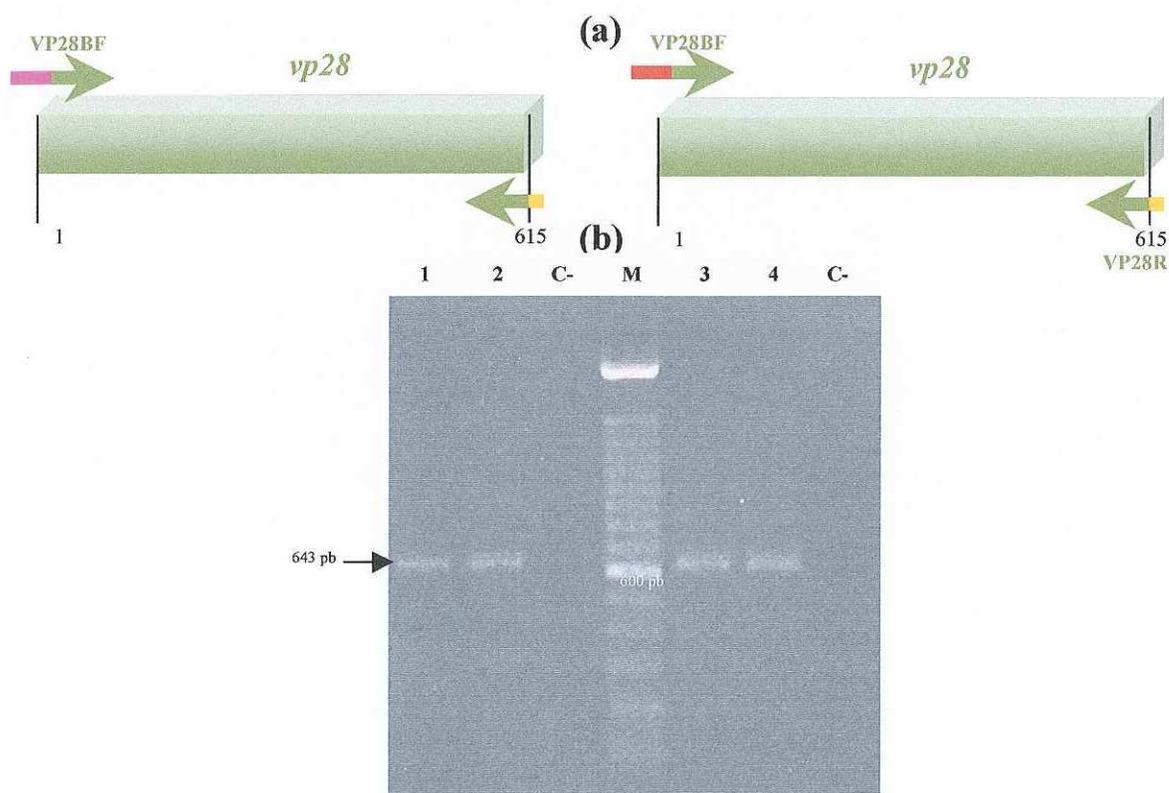


Figura 22. (a) Diseño teórico de fragmentos amplificados VP28. (b) Electroforesis. Se observan bandas de amplificación del gen *vp28* con secuencias 5' para fusión con *cotB* (1, 2) y para fusión con *cotC* (3, 4). El fragmento esperado de 643 pb se indica con el marcador de peso molecular (M). Se muestra un control negativo de la amplificación (C-).

VI.6 Fusión en fase de genes *cot* de *B. subtilis* y genes *vp* de WSSV.

VI.6.1 Fusión del gen *cotB* (*B. subtilis*) con el gen *vp26* (WSSV).

En la fig. 23a se muestra una representación esquemática de la fusión de los genes *cotB* y *vp26*, que hibridan en el extremo 3' del gene *cotB* con el extremo 5' del gene *vp26*. Como producto de esta fusión se obtuvo un fragmento de ~1761 pb llamado BVP26. De acuerdo al diseño teórico de la fusión, la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI, la barra rosa representa al gene *cotB* de *B. subtilis* (-263/825 nt), la barra azul representa al gene *vp26* del Virus de la Mancha Blanca (1/616 nt) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRI.

En la fig. 23b, se observa la amplificación por PCR sobrelapante de la fusión de los genes *cotB* y *vp26* en gel de agarosa, presentando resultados acordes a los teóricos esperados de un fragmento de ~1761 pb. También se presenta la amplificación de los fragmentos sin fusionarse, CotB de 1117 pb y VP26 de 644 pb.

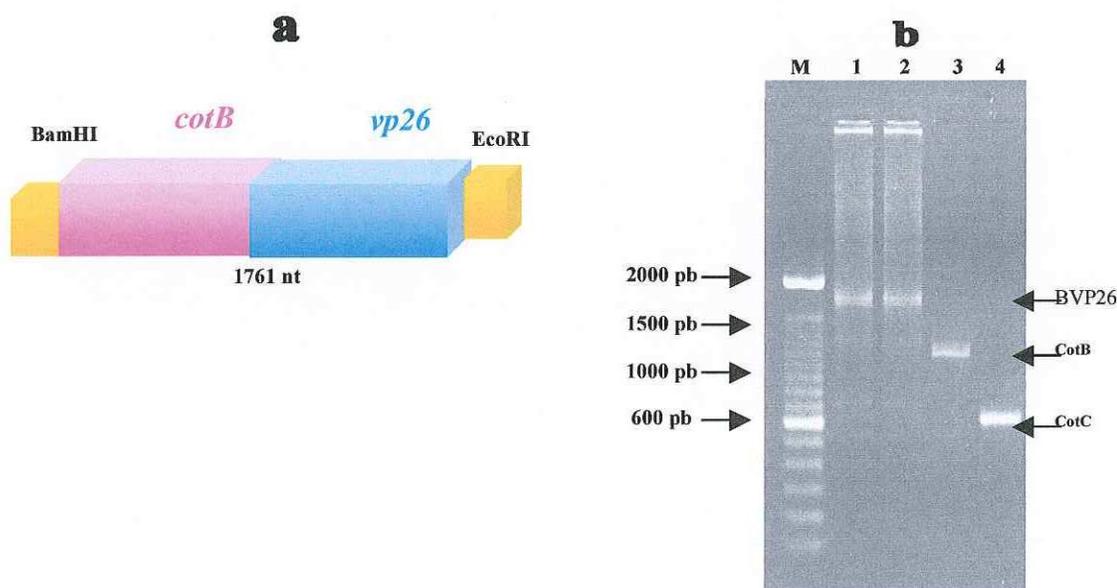


Figura 23. (a) Vista esquemática de la fusión de genes *cotB* con *vp26*. **(b)** Electroforesis. Se observa la fusión de *cotB* y *vp26* (1, 2). El tamaño del fragmento esperado BVP26, como producto de la fusión del gene *cotB* de 1117 pb (3) con *vp26* de 644 pb (4), es de 1761 pb y se indica con el marcador de peso molecular (M).

VI.6.2 Fusión del gen *cotB* (*B. subtilis*) con el gen *vp28* (WSSV).

En la fig. 23c se muestra una representación esquemática de la no fusión de los genes *cotB* y *vp28*, estos debieron de hibridar en el extremo 3' del gene *cotB* con el extremo 5' del gene *vp28*, esperando un fragmento de ~1760 pb nombrado BVP28. De acuerdo al diseño teórico de la fusión, la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI, la barra rosa representa al gene *cotB* de *B. subtilis* (-263/825 nt), la barra verde representa al gene *vp28* del Virus de la Mancha Blanca (1/615 nt) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRI.

En la fig. 23d, se representa la amplificación por PCR sobrelapante en gel de agarosa, donde se observa que no se obtuvo la fusión de los genes *cotB* y *vp28* (pozo 1 y 2), se esperaba un fragmento de ~1760 pb. En el pozo 3 y 4 se presenta la amplificación de los fragmentos sin fusionarse, CotB de ~1117 pb y VP28 de ~643 pb.

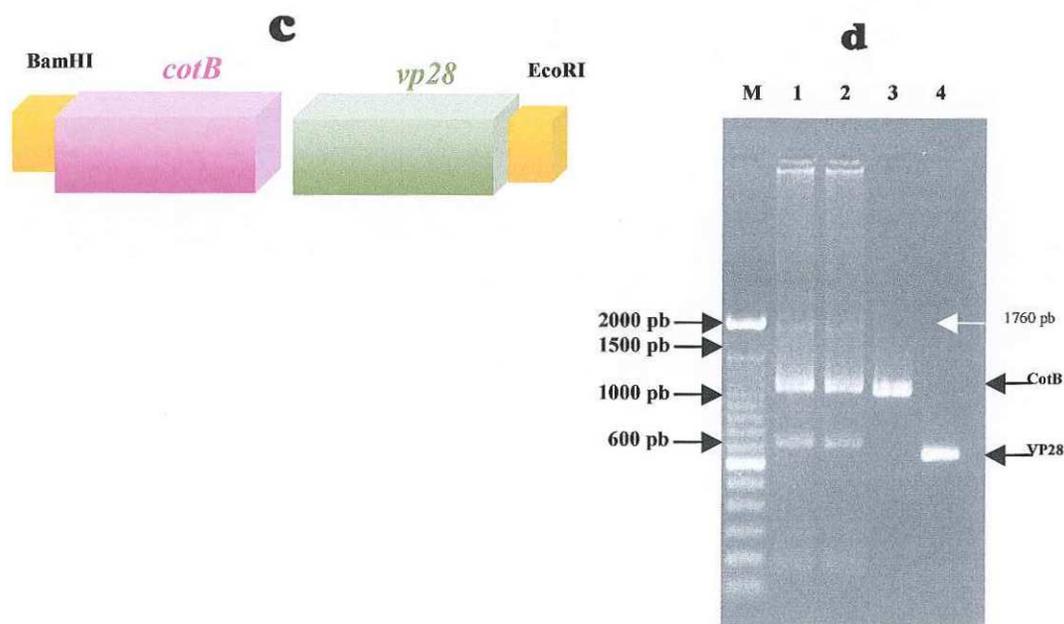


Figura 23. (c) Vista esquemática de la No fusión de genes *cotB* y *vp28*. **(d)**. En el carril 1 y 2 se muestra que no se obtuvo fusión de los genes *cotB* (3) y *vp28* (4), se esperaba un tamaño de banda de 1760 pb, a nivel de la flecha blanca.

VI.6.3 Fusión del gen *cotC* (*B. subtilis*) con el gen *vp26* (WSSV).

En la fig. 24a se muestra una representación esquemática de la fusión de los genes *cotC* y *vp26*, que hibridan en el extremo 3' del gene *cotC* con el extremo 5' del gene *vp26*. Como producto de esta fusión se obtuvo un fragmento de ~1048 pb nombrado CVP26. De acuerdo al esquema teórico de la fusión, la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI, la barra roja representa al gene *cotC* de *B. subtilis* (-23/354 nt), la barra azul representa al gene *vp26* del Virus de la Mancha Blanca (1/616 nt) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRV.

En la fig. 24b, se observa la amplificación por PCR sobrelapante de la fusión de los genes *cotC* y *vp26* en gel de agarosa, presentando resultados acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 1048 pb. También se presenta la amplificación de los fragmentos sin fusionarse, CotC de 406 pb y VP26 642 pb.

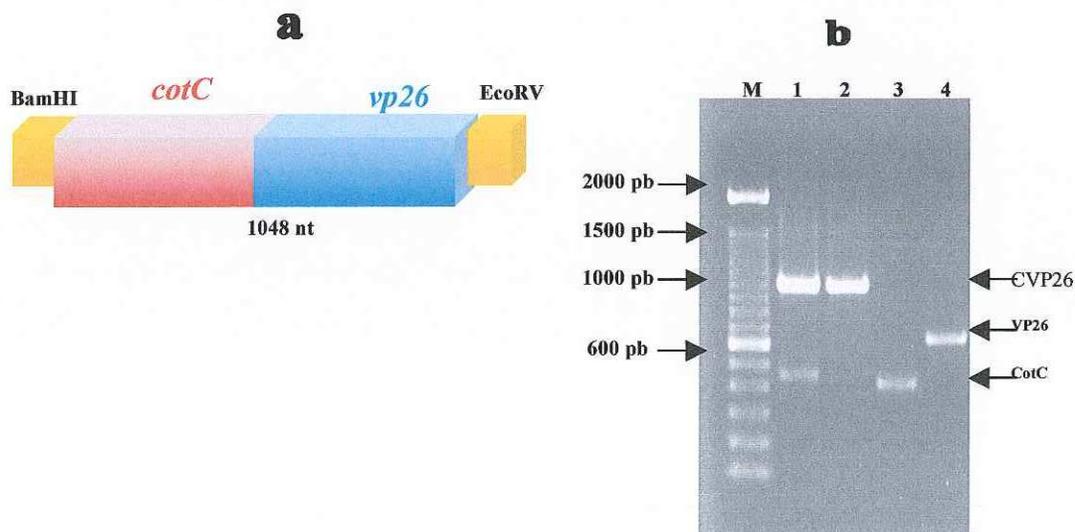


Figura 24 (a) Vista esquemática de la fusión del gene *cotC* con *vp26*. **(b)** Electroforesis. Se observa la fusión de *cotC* y *vp26* (1, 2). El tamaño del fragmento esperado CVP26 es de 1048 pb, como producto de la fusión del gene *cotC* de 406 pb (3) con *vp26* de 642 pb (4).

VI.6.4 Fusión del gen *cotC* (*B. subtilis*) con el gen *vp28* (WSSV).

En la fig. 24c se muestra una representación esquemática de la fusión de los genes *cotC* y *vp28*, que hibridan en el extremo 3' del gene *cotC* con el extremo 5' del gene *vp28*. Como producto de esta fusión se obtuvo un fragmento de ~1049 pb nombrado CVP28. De acuerdo al esquema teórico de la fusión, la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima BamHI, la barra roja representa al gene *cotC* de *B. subtilis* (-23/354 nt), la barra verde representa al gene *vp28* del Virus de la Mancha Blanca (1/615 nt) y la barra amarilla representa un sitio de corte para la enzima EcoRI.

En la fig. 24d, se observa la amplificación por PCR sobrelapante de la fusión de los genes *cotC* y *vp28* en gel de agarosa, presentando resultados acordes a los teóricos esperados de un fragmento de 1049 pb. También se presenta la amplificación de los fragmentos sin fusionarse, CotC de 406 pb y VP28 de 643 pb.

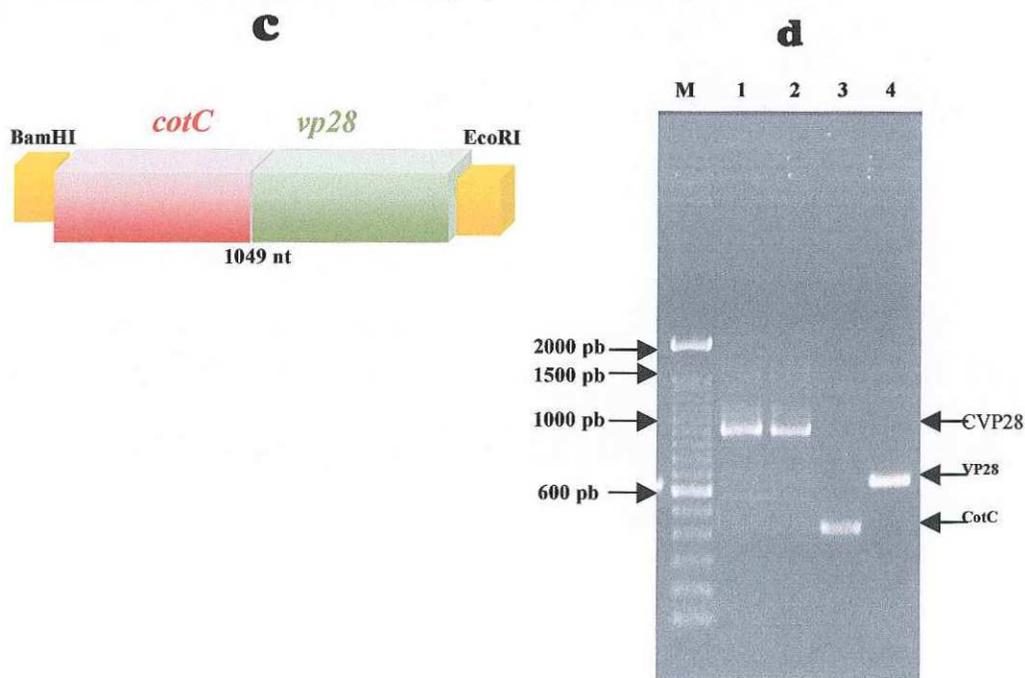


Figura 24. (c) Vista esquemática de la fusión del gene *cotC* con *vp28*. (d) Electroforesis. Se observa la fusión de *cotC* y *vp28* (1, 2). El tamaño del fragmento esperado CVP28, como producto de la fusión del gene *cotC* de 406 pb (3) con *vp28* de 643 pb (4), es de 1049 pb y se indica con el marcador de peso molecular (M).

Los genes *cotB* y *CotC* de *B. subtilis* y los genes *vp26* y *vp28* de WSSV fueron amplificados exitosamente y el patrón de bandeo observado en el gel de electroforesis coincide con los resultados teóricos esperados. Las muestras se analizaron por duplicado tal y como lo recomienda Rodríguez y Barrera, 2004.

Con lo que respecta a las fusiones por PCR sobrelapante de estos genes amplificados, no se logró fusionar el gen *cotB* con el gen *vp28*. Estos productos de PCR se purificaron (Kanoksilapatham, 2007), su región complementaria presenta más de 12 nucleótidos seguidos de más de 21 nucleótidos de la secuencia del fragmento por fusionar (Wurch, 1998). No se usó un alto número de ciclos en el programa de amplificación ya que la tasa de error es proporcional al número de éstos (Rodríguez y Barrera, 2004).

Se piensa que una de las posibles causas por las cuales no se obtuvo la fusión de los genes es la temperatura de hibridación usada para lo cual se sugiere realizar gradiente de temperaturas en el programa de hibridación y seleccionar la adecuada. Cabe mencionar que los genes *cotB* y *vp28* ya han sido exitosamente amplificados en este trabajo, vease fig. 18 y 21.

Sería interesante probar el uso de oligonucleótidos anidados en la segunda etapa del PCR sobrelapante ya que según Shevchuk, 2004, promueve significativamente el éxito de la reamplificación.

VI.7 Construcción del plásmido pDGCVP26 a partir de pDG1662 y CVP26.

VI.7.1 Digestión y purificación del plásmido pDG1662 y fragmento CVP26.

La digestión del plásmido pDG1662 y del fragmento sobrelapante CVP26 se realizó conforme al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. En la digestión del plásmido pDG1662 la escisión con las enzimas BamHI y EcoRV dio como resultado un fragmento de 5500 pb y uno de ~1400 pb, dejando un extremo cohesivo (BamHI) y un extremo rasurado (EcoRV). En la figura 25 carril 1 y 2 se muestran las bandas sobre gel de agarosa que

representan la digestión de pDG1662. En el carril 3 se muestra a pDG1662 sin digerir usado como control +. La digestión del fragmento CVP26 dio como resultado un fragmento de ~1048 pb (fig. 26) con extremos similares a los descritos para la digestión de pDG1662.

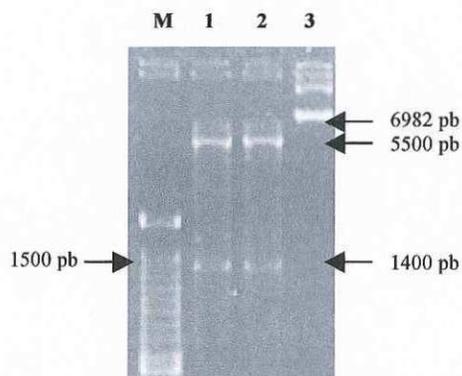


Figura 25. Digestión de pDG1662 con BamHI y EcoRV. (1, 2) Las bandas superiores corresponden al fragmento de 5500 pb, las inferiores corresponde al fragmento escindido de ~1400 pb. (3) pDG1662 control +. (M) marcador molecular.

La recuperación de los fragmentos deseados (fragmento de ~5500 pb para el vector y de 1048 pb para el inserto) se llevó a cabo mediante la purificación con el método fenol-cloroformo (véase Materiales y métodos), logrando una buena recuperación de ADN (Fig.26). Estos fragmentos de ADN fueron utilizados en la reacción de ligación descrita en Materiales y métodos.

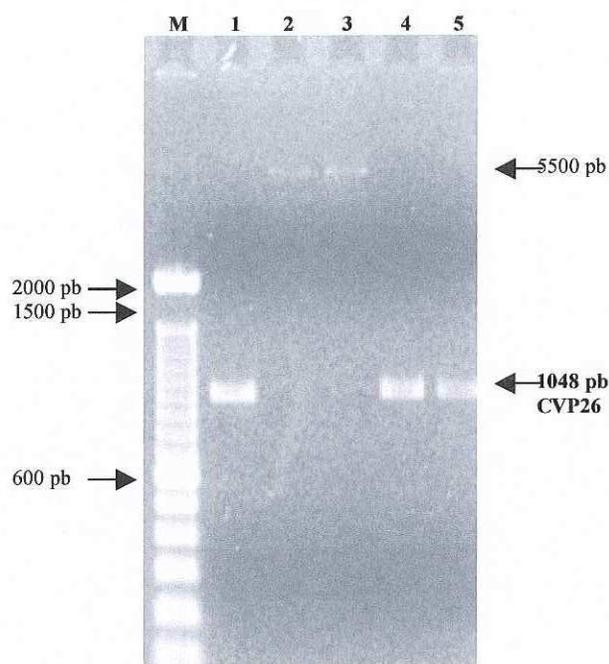


Figura 26. Gel de electroforesis. Se observa el ADN de interés purificado. Los carriles 4, 5 corresponden a muestras del fragmento CVP26 (fusión de *cotC* y *vp26*) digerido y purificado, el carril 1 corresponde a un control +. Los carriles 2 y 3 corresponden al fragmento de 5500 pb purificado (plásmido pDG1662 digerido).

VI.7.2 Ligación del plásmido pDG1662 e inserto CVP26.

La ligación del inserto CVP26 con el vector pDG1662 da origen a un nuevo vector llamado pDGCVP26 (Fig. 27), el cual contiene la fusión de los genes *cotC* y *vp26*. Este plásmido se integró en el genoma de *B. subtilis*. Para dicho propósito, pDGCVP26 cuenta con dos sitios de recombinación del gene *amy* (forward y back), que en *B. subtilis* codifica para la enzima amilasa, efectuándose una recombinación homóloga doble. El tamaño original del plásmido pDG1662 es de 6982 pb, pero con la escisión de un fragmento de ~1400 pb en la digestión y la ligación de CVP26 de un tamaño de 1048 pb, el tamaño del plásmido pDGCVP26 es de ~6500 pb, poco menor al plásmido parental.

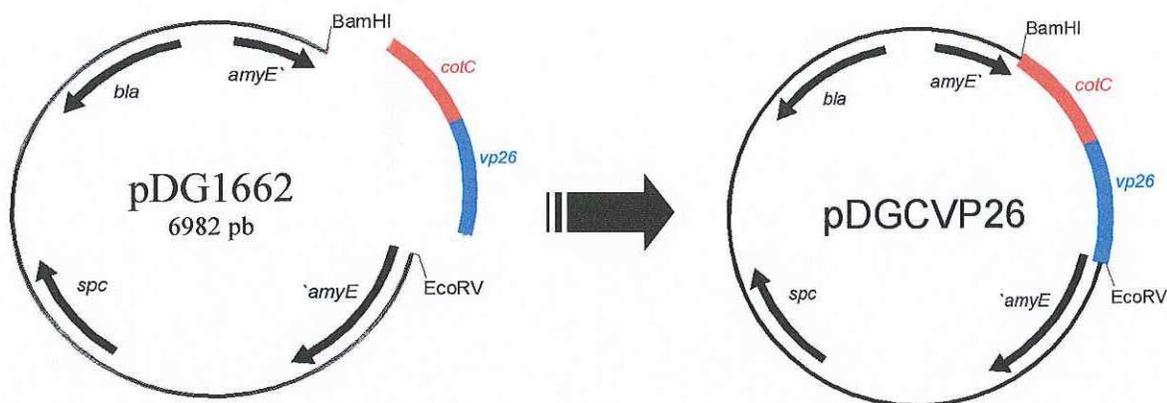


Figura 27. Plásmido pDGCVP26, resultado de la inserción del gene *cvp26* en el vector de integración pDG1662.

VI.8 Transformación de *E. coli* DH5 α con pDGCVP26.

La cepa *E. coli* DH5 α , químicamente competente, se transformó con el plásmido pDGCVP26. A 50 μ l de *E. coli* se le agregó 7.5 μ l del producto de ligación del plásmido pDG1662 e inserto CVP26. Se sembró 200 μ l de la transformación en cajas petri con LB 50 μ g/ml de ampicilina. Para la eficiencia de Transformación se agregó 1 μ l de pDG1662 en 50 μ l de la cepa competente en condiciones de plaqueo similares a las ya mencionadas y para el blanco de transformación se sembró 50 μ l de células competentes. En la tabla XVI se muestra el número de colonias crecidas por placa en la transformación de *E. coli* DH5 α con pDGCVP26. Presentándose un total de 18 unidades formadoras de colonias (UFC), una buena eficiencia de transformación de 154 UFC y un nulo crecimiento del blanco de transformación, tal como se esperaba.

No todas las células del cultivo se hacen competentes. La eficiencia de transformación de mezclas de ligación es de hasta 50 veces menor que la que se obtiene con

plásmidos superenrollados ya que la cantidad de ADN usada es menor. Esto coincide con los resultados obtenidos mostrados en la tabla XVI.

Tabla XVI. UFC obtenidas en la transformación de la cepa *E. coli* DH5 α con pDGCVP26.

Cultivo en LB 50 μ g/ml de ampicilina	No. de Colonias Crecidas
<i>E. coli</i> DH5 α + pDGCVP26	5
<i>E. coli</i> DH5 α + pDGCVP26	8
<i>E. coli</i> DH5 α + pDGCVP26	3
<i>E. coli</i> DH5 α + pDGCVP26	2
Total de Colonias crecidas	18
Eficiencia de Transformación	154
Blanco de Transformación <i>E. coli</i> DH5 α	No hubo crecimiento

Posteriormente se realizó una extracción y purificación de ADN plasmídico de las 18 colonias crecidas en la transformación. Para ello fue necesario crecer las colonias en medio LB líquido por 6 horas. En la Fig. 28, se observa en gel de agarosa las 18 extracciones de ADN plasmídico de las colonias que presentaron resistencia a ampicilina 50 μ g/ml.

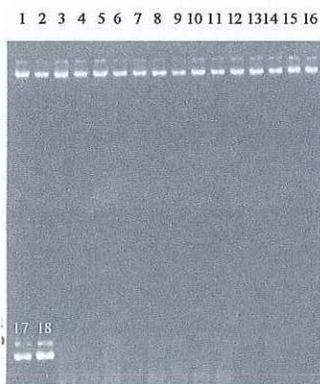


Figura 28. Electroforesis de la extracción y purificación de ADN plasmídico de las 18 colonias que presentaron resistencia a ampicilina como consecuencia de la transformación con pDGCVP26.

El ADN plasmídico de las extracciones mostradas en la fig. 28, se usó como molde para la amplificación del fragmento CVP26, usando para ello 1 μ l del oligo CF (forward) y 1 μ l del oligo VP26R (reverse) y confirmar por medio de la técnica de PCR cuáles clonas son las que amplifican el fragmento deseado. En la fig. 29 y 30 se muestran las clonas que amplificaron el fragmento de 1048 pb. Las clonas número 3, 10–13 fueron las que amplificaron a CVP26.

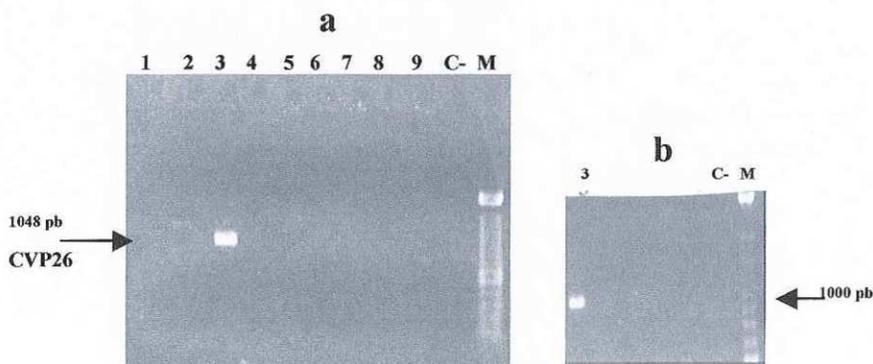


Figura 29. (a) Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de CVP26 en la clona 3. (b) Se muestra una ampliación del gel con la clona no. 3 que amplificó el fragmento junto a un (M) marcador de peso molecular que indica el tamaño del fragmento. (C-) control negativo.



Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de CVP26 en las clonas 10–13. (M) marcador de peso molecular que indica el tamaño del fragmento. (C-) control negativo.

Se realizó una amplificación por PCR de los fragmentos CotC y VP26 en las 5 clonas que amplificaron el fragmento CVP26 de 1048 pb, (Clona no. 3, 10-13). Las extracciones de ADN plasmídico de las clonas 3, 10-13 (fig. 28) fueron usadas como ADN molde y se usaron oligos CF (forward) y CRVP26 (reverse) para amplificación del fragmento CotC de un tamaño de 406 pb y los oligos VP26FC (forward) y VP26R (reverse) para amplificación del fragmento VP26 de un tamaño de 642 pb. Las 5 clonas amplificaron ambos fragmentos, fig.31.

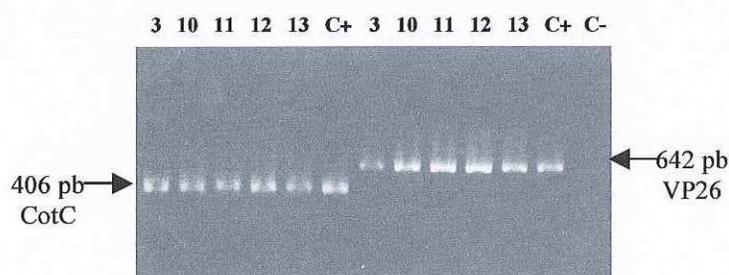


Figura 31. Amplificación de CotC y VP26 en las 5 clonas que amplificaron el fragmento fusión CVP26. (C+), control positivo. (C-), control negativo.

Los resultados mostrados confirman la presencia del fragmento CVP26 en 5 clonas de *E. coli*. El plásmido fue recuperado a partir de una extracción de ADN plasmídico. Esto se realizó con la finalidad de multiplicar el número de copias de pDGCVP26 para su uso en el proceso de transformación de *B. subtilis* con el plásmido construido.

VI.9 Transformación de *B. subtilis* con pDGCVP26.

El proceso de transformación nos permite introducir distintos fondos genéticos en una cepa de referencia, en este caso la BB80 *hys gly* se llevó al estado de competencia y se transformó con el plásmido pDGCVP26, obteniendo la cepa BB8026 *hys gly* pDGCVP26.

VI.9.1 Selectividad de colonias por medio de la degradación de almidón.

El plásmido pDGCVP26, que en *E. coli* otorga resistencia a ampicilina y espectinomina, no proporciona a *B. subtilis* resistencia a ningún antibiótico, debido a que la región de recombinación en *amy* no contiene ningún gen de resistencia a antibióticos. Esto se compensa por una selectividad a partir de las colonias que no presentan actividad de la amilasa como consecuencia de la inactivación del gen *amy* en *B. subtilis* al insertarse el plásmido pDGCVP26.

En la fig. 32 se muestra una placa con medio LB (a) y LB-Almidón (b) con 50 colonias de *B. subtilis* BB80 *hys gly* resultantes del proceso de transformación con el plásmido pDGCVP26. Las colonias que no presentaron un halo de degradación del almidón (fig. 32b) corresponden a clonas que integraron a pDGCVP26, al ser incapaces de degradar almidón del medio, debido a la inactivación del gen *amy* responsable de la producción de amilasas. El almidón del medio al reaccionar con Yodo da un patrón de coloración oscuro.

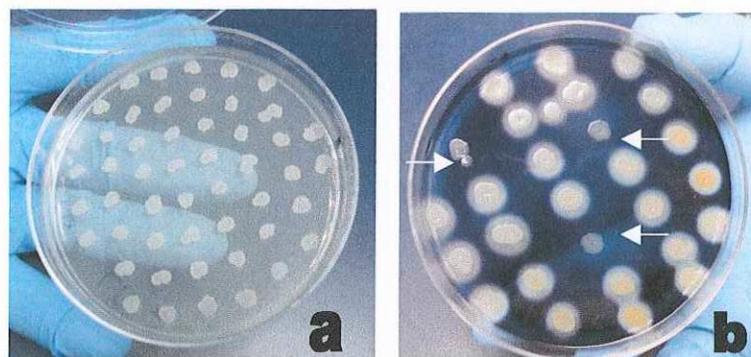


Figura 32 (a). Cultivo de *B. subtilis* transformada con pDGCVP26. **(b).** Tinción de yodo sobre el almidón del medio. Muestra las colonias incapaces de producir amilasas (las que no presentan halo de degradación de almidón), como consecuencia de la inactivación del gen *amy*.

En la fig. 32b se muestra con flechas que 3 clonas no presentaron halo de degradación sugiriendo que han integrado a pDGCVP26. Esto se debe a que no todas las células de un mismo cultivo son transformables en cualquier momento del ciclo de

crecimiento. En *Bacillus subtilis* solamente una minoría (1-20%) de células se hacen competentes, y solo durante la fase estacionaria (Dubnau, 1991). Este estado de competencia es diferente para cada especie bacteriana capaz de experimentar transformación, y dentro de cada especie está influido por una serie de parámetros como: densidad celular del cultivo, temperatura, pH, nutrientes (fuentes de C, N, iones).

VI.9.2 Comprobación de la presencia del inserto CVP26 en las clonas seleccionadas.

Se seleccionaron 10 colonias crecidas en la transformación de *B. subtilis* para realizar extracción y purificación de su ADNcr. Para ello fue necesario crecer las colonias en medio LB líquido por 6 horas. En la Fig. 33, se observa en gel de agarosa las 10 extracciones de ADNcr, 3 de las cuales corresponden a colonias incapaces de producir amilasas, como consecuencia de la inactivación del gene *amy* en la transformación de *B. subtilis* con pDGCVP26.

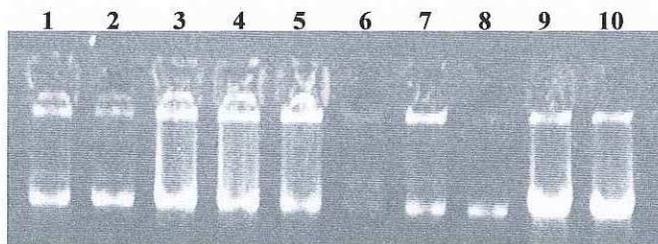


Figura 33. Electroforesis de la extracción y purificación de ADNcr de *B. subtilis*.

Por medio de PCR se amplificó el fragmento CVP26 usando el ADNcr como molde, 1 µl del oligo CF (forward) y 1 µl del oligo VP26R (reverse). En la fig. 34 se muestra que de las 10 clonas seleccionadas, la no. 3, 5 y 8 amplificaron el fragmento esperado CVP26 de 1048 pb, observándose una banda cerca de la de 1000 pb del marcador molecular empleado. Las bandas correspondientes a las clonas se encuentran alineadas al control positivo.

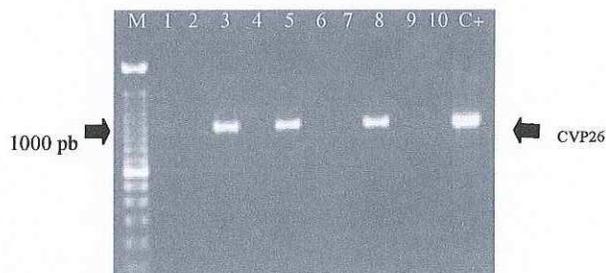


Figura 34. Electroforesis donde se muestra la amplificación de CVP26 en las clonas 3, 5 y 8. (C+), control positivo; (M), marcador molecular.

Las clonas que amplificaron el fragmento CVP26 son aquellas que en la técnica de selectividad por medio de la degradación de almidón en el medio de cultivo no presentaron halo y reaccionaron con el Yodo al teñirse de oscuro en su periferia debido a la integración del fragmento deseado y consecuente inactivación del gene *amy* en *Bacillus subtilis*.

Las 3 clonas que por la técnica de PCR muestran amplificación de CVP26 nos indican que en el genoma de *B. subtilis* BB80 *hys gly* se integró satisfactoriamente el fragmento fusión, por lo que se le a dado el nombre a esta cepa de *Bacillus subtilis* BB8026 *hys gly* CVP26.

A la fecha no se ha reportado cepas de *B. subtilis* genéticamente modificadas con genes que codifican para proteínas de la envoltura del virus de la mancha blanca. Por lo que se muestra atractivo el uso de sistemas de expresión de *B. subtilis* para el despliegue de proteínas altamente antigénicas como es el caso de VP26 del WSSV.

Se espera que la cepa construída en este trabajo, *Bacillus subtilis* BB8026 *hys gly* CVP26, pueda expresar la proteína heteróloga sobre la envoltura externa de la espora y usar esta última para inducir en camarones inmunización pasiva, como preventivo o disminución de la tasa de mortalidad de camarones infectados por el virus de la mancha blanca. Por lo que es necesario darle continuidad a esta investigación y probar que esta cepa presenta esporas genéticamente modificadas.

VII. CONCLUSIONES

- En base a los resultados presentados de cada una de las PCR's realizadas se observa que los fragmentos base funcionaron adecuadamente y la fusión en fase programada de ellos se obtuvo satisfactoriamente, sin embargo para una de las fusiones es necesario realizar un gradiente de temperaturas y elegir la adecuada para los fines propuestos.
- A partir de la fusión programada CVP26 se construyó exitosamente el vector de integración pDGCVP26.
- De acuerdo a los resultados expuestos se construyó una cepa de *Bacillus subtilis* que incluye el gen *vp26* del Virus de la Mancha Blanca que codifica para la proteína mayor VP26.
- No ha sido reportado a la fecha, la expresión de genes del Virus de la Mancha Blanca sobre esporas de *B. subtilis*, al ser una manipulación genética novedosa se espera que la cepa genéticamente modificada, *B. subtilis* BB80 *hys gly* CVP26, exprese sobre la envoltura externa de su espora una proteína heteróloga nombrada CVP26.

VIII. PERSPECTIVAS

- Determinar la cinética de crecimiento de la cepa construída, BB8026 *hys gly* pDGCVP26 y compararla con otras cepas de *Bacillus subtilis*.
- Fusionar en fase el gene *cotB* de *B. subtilis* y *vp28* de WSSV.
- Detectar y confirmar la expresión de la proteína fusión sobre la capa externa de la espora de *B. subtilis* por medio del uso de anticuerpos específicos.
- Determinar cuantitativamente la expresión de la proteína heteróloga sobre la espora.
- Comprobar que la expresión de la proteína fusión no afecta significativamente a la estructura y función de la espora.
- Probar la eficiencia de la espora recombinante de *B. subtilis* como estimulador del sistema de defensa de *Litopenaeus vannamei*.

BIBLIOGRAFÍA

Barák I., Ricca E. y Cutting S. 2005. From fundamental studies of sporulation to applied spore research *Molecular Microbiology* 55 (2): 330–338.

Chaivisuthangkura P., Tangkhabuanbutra J., Longyant S., Sithigorngul W., Rukpratanporn S., Menasvetab P. y Sithigorngula P., 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *Science Asia* 30: 359-363.

Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chuang HC, y Lo CF. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23, 165-73.

Colombo P., 2000. Análisis de la región de regulación del gene *aprE* de *Bacillus subtilis* mediante footprinting *in-vivo*. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 53 pp.

Donovan, W., L. Zheng, K. Sandman y R. Losick. 1987. Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 196:1–10.

Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:1–20.

Dubnau, D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55: 395-424.

Duc L.H. y Cutting S.M. 2003a. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicle. *Expert Opin Biol Ther* 3:1263-1270.

Duc le, H., H.A. Hong, N. Fairweather, E. Ricca, y S.M. Cutting. 2003. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Infect. Immun.* 71:2810-2818.

Duc, L.H., Hong, H.A., Uyen, N.Q. y Cutting, S.M. 2004. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine* 22: 1873–1885.

Durand S., Lightner D.V., Redman R.M., Bonami JR, 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Dis Aquat Org.* 29:205-211.

Ferreira L., Ferreira R., Schumqnn W., 2005. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development from antigen factories to delivery vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77 (1):113-124.

Grande-Pérez A. 2004. Diseño de oligonucleótidos para PCR. Ingeniería Genética curso 2004-2005. Campusvirtual.um.es.

Green, D., P. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca y S. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotic species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4288–4291.

Guérout-Fleury, A. M., N. Frandsen, P. Stragier. 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180:57-61.

Henriques, AO; Moran, C. P. 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* 20:95–110.

Hoa, N.T., L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P. H. Van, S. Ammendola, E. Ricca y S. Cutting. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5241–5247.

<http://bacillus.genome.jp/>, BSORF. Consultado en Agosto del 2007.

<http://espanol.istockphoto.com>. Consultado en marzo del 2008.

http://www.expasy.org/uniprot/COTC_BACSU. Consultado en octubre del 2007.

<http://www.expasy.org/uniprot/P07789>. Consultado en octubre del 2007.

<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>, Subtilist. Consultado en Agosto del 2007.

<http://www.es.geocities.com/joakinicu/apartado31.htm>. Consultado en Enero del 2008.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NCBI (National Center for Biotechnology Information). Consultado en Agosto del 2007.

Innis, M.A. y Gelfand, D.H. 1994. Optimization of PCRs, in *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., Ed., CRC Press, London, p 5-11.

Isticato Rachele, Donatella Scotto Di Mase, Emilia M.F. Mauriello, Maurilio De Felice y Ezio Ricca. 1997. Amino terminal fusion of heterologous proteins to CotC increases display efficiencies in the *Bacillus subtilis* spore system. *BioTechniques* 42 (2):51-156.

Isticato R, Cangiano G, Tran HT, Ciabattini A, Medaglini D, Oggioni MR, De Felice M, Pozzi G. y Ricca E. 2001. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 183:6294-6301.

Isticato R, Esposito G, Zilhao R, Nolasco S, Cangiano G, De Felice M, Henriques AO, Ricca E. 2004. Assembly of multiple CotC forms into the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* in press.

Ivins BE y Welkos SL. 1986. Cloning and expression of *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun* 54:537-542.

Jha R.K. y Xu Z-r., 2005. Production of recombinant enveloped structural proteins from The chinese wssv isolate. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20 (2) 136-141.

Kanoksilapatham Wirojne, Juan M. Gonzalez, Frank T. Robb. 2007. Directed-Mutagenesis and Deletion Generated through an Improved Overlapping-Extension PCR Based Procedure. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 1 (2).

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer.1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249– 256.

Kurtz, J. y K. Franz. 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425:37–38.

Lam, K. H., K. C. Chow y W. K. Wong. 1998. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* 63:167–177.

Lee SY, Choi JH, Xu Z. 2003. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*, 21(1):45-52.

Leu, J. H., J. M. Tsai, H. C. Wang, A. H. Wang, C. H. Wang, G. H. Kou y C. F. Lo. 2005. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *J. Virol.* 79:140–149.

Lightner, D. V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Mauriello EMF, Duc LH, Istatico R, Cangiano G, Hong HA, de Felice M, Ricca E. y Cutting SM. 2004. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine* 22:1177-1187.

Maurer J, Jose J, Meyer TF. 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 179(3):794-804.

Mazza, P. 1994. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Boll. Chim. Farm.* 133:3-18.

McBride BW, Mogg A, Telfer JL, Lever MS, Miller J, Turnbull PCB y Baillie L. 1998. Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* 16 (8):810-817.

Molina G.Z., Galaviz S.L., Alcocer J.M., Rosales E.J., 2007. Filogénia de las Proteínas Estructurales del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) patógeno de *Litopenaeus ssp.* *Ciencia UANL*, X (003):275-281.

Nicholson WJ, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:548-572.

Nguyen TN, Gourdon MH, Hansson M, Robert A, Samuelson P, Libon C, Andreoni C, Nygren PA, Binz H, Uhlen M. 1995. Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *J Biotechnol* 42(3):207-219.

Olmos J., Contreras R., 2003. Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Biotechnol* 62:369-373.

Oggioni MR, Ciabattini A, Cuppone AM y Pozzi G. 2003. *Bacillus* spore for vaccine delivery. *Vaccine* 31:96-101.

Pero, J. y A. Sloma. 1993. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. ASM Press, Washington, D.C. p. 939-952.

Ricca E. y Cutting SM, 2003. Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology *Journal of Nanobiotechnology* 1:6-15.

Rodríguez S. y Barrera S. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL VII* (3).

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning, a laboratory manual". C. Nolan (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 879 pp.

Shevchuk, Nikolai; Bryksin, Anton V.; Nusinovich, Yevgeniya A.; Cabello, Felipe C.; Sutherland, Margaret; Ladisch, Stephan. 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*. 32(2):19.

Sritunyalucksana, K., W. Wannapapho, C. F. Lo y T. W. Flegel. 2006. PmRab7 Is a VP28-Binding Protein Involved in White Spot Syndrome Virus Infection in Shrimp. *J Virol* 80:10734-42.

Tsai JM., Wang HC., Leu JH., Wang A.H.-J., Zhuang Y., Walker P.J., Kou G.H. y Lo CF., 2006. Identification of the Nucleocapsid, Tegument, and Envelope Proteins of the Shrimp White Spot Syndrome Virus Virion. *J. Virol.* 80(6):3021-3029.

Van Hulten, M. C. W. y Vlak, J. M. (2000). Genetic evidence for a unique taxonomic position of white spot syndrome virus of shrimp: genus Whispovirus. *Proceedings of the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Edited by C. Lavilla-Pitogo and others (in press).

Van Hulten, M. C. W., Westenberg, M., Goodall, S. D. y Vlak, J. M. 2000a. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227–236.

Van Hulten, M. C., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou y J. M. Vlak. 2000b. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes, and repeat regions. *J. Gen. Virol.* 81:307–316.

Van Hulten M.C., Witteveldt J., Snippe M. y Vlak J.M. (2001) White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285: 228-233.

Venegas, C. A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa y K. Muroga. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.* 42:83–89.

Venkata G. R. Chada, Erik A. Sanstad, Rong Wang y Adam Driks, 2003. Morphogenesis of *Bacillus* Spore Surfaces. *Journal Of Bacteriology*, 185 (21):6255–6261.

Vlak J.M., Bonami JR., Flegel T.W., Kou GH., Lightner D.V., Lo CF., Loh P.C., Walker P.J., 2002. A new virus family infecting aquatic invertebrates. XIIIth International Congress of Virology, Paris.

Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S. y Kou, G.H. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquacult.* 164:221-231.

Wang, Q., Nunan, L.M. y Lightner, D.V. 2000. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and southern blot hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 43: 175-181.

Wayne Davis, 2005. Software Ape (A plasmid Editor v 1.10.4, University of California).

Westers, L.; Wverters, H. and Quax, W. J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694: 299-310.

Witteveldt J., Cifuentes C.C., Vlak J.M. y van Hulst M.C.W., 2004 . Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination. *Journal of Virology* 78 (4): 2057–2061.

Witteveldt Jeroen, Just M. Vlak y Mariÿlle C.W. van Hulst. 2006. On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus. Chapter 6, Duration and onset of protection via injection of a subunit vaccine in *Penaeus monodon*, Thesis Wageningen University, p 63.

Witteveldt Jeroen, Just M. Vlak and Mariÿlle C.W. van Hulst. 2006. On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus. Chapter 8, Protection of Penaeid shrimp against WSSV using oral vaccination. Thesis Wageningen University, p 87.

Wu, J. L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nishizawa y K. A. Muroga. 2002. Time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 391–403.

Wurch Thierry, Lestienne Fabrice y Pauwels Petrus J.1998. A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques* 12 (9):653–657.

Xuhua Tang, Jinlu Wu, J. Sivaraman y Choy Leong Hew, 2007. Crystal Structure of Two Major Envelope Proteins VP26 and VP28 from White Spot Syndrome Virus (WSSV) Shed Light on their Evolutionary Relationship. *J Virol.* 81(12): 6709–6717.

Yang F., He J., Lin X., Li Q., Pan D., Zahang X., Xu X., 2001. Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. *J. Virol.* 75 (23):11811-11820.

Yi G., Wang Z., Qi Y., Yao L., Qian J. y Hu L., 2004. Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(6):726-734.

Zilhao R, Isticato R, Ozin AJ, Serrano M, Moran CP, Ricca E, Henriques AO. 2004. Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* in press.

Zheng, L. y R. Losick. 1990. Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 212:645-660.