

Tesis defendida por  
Ana Karina Espinoza Villalva  
y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Jorge Olmos Soto  
Director del Comité

---

Dr. José de Jesús Paniagua Michel  
Miembro del Comité

---

Dr. Israel Marck Martínez Pérez  
Miembro del Comité

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
Coordinador  
del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de la  
Dirección de Estudios de Posgrado

Marzo 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

Programa de Posgrado en Ciencias  
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

---

Generación de una cepa de *Bacillus subtilis* como modelo de expresión de ARN de proteínas  
virales para el control del virus de la mancha blanca

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:  
Ana Karina Espinoza Villalva

Ensenada, Baja California, México  
2014

Resumen de la tesis de Ana Karina Espinoza Villalva, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Generación de una cepa de *Bacillus subtilis* como modelo de expresión de ARN de proteínas virales para el control del virus de la mancha blanca.

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Olmos Soto

México ocupa el lugar número 4 dentro de los principales países productores de Acuicultura de América Latina y el Caribe. En México existen 402 granjas (45 mil Ha) destinadas al cultivo de camarón, ubicadas en Sonora, Sinaloa y Nayarit. Uno de los problemas importantes en el cultivo de camarón es el impacto causado por patógenos virales. El virus de la mancha blanca, WSSV por sus siglas en inglés, es actualmente el patógeno viral más letal a nivel mundial. El potencial del ARN de interferencia (ARNi) está siendo explorado como tratamiento terapéutico de infecciones virales. Estudios recientes sugieren el uso de sistemas de expresión procariotas para el control del WSSV. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram (+), no patógena, reconocida como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA, cuenta con actividad probiótica y crece en medios simples y económicos, características que la convierten en un candidato ideal para la producción de antígenos heterólogos y su uso en la producción de vacunas. Se generó una cepa de *B. subtilis* que contiene la información para expresar ARN de interferencia del gen de la proteína VP28 del WSSV y se evaluó su capacidad de protección frente a la infección con WSSV. Los organismos a los que se les administró la cepa de *B. subtilis* transformada lograron sobrevivir a la infección por un periodo de tiempo más prolongado. El presente estudio muestra que la administración oral de pellets recubiertos con *B. subtilis* productora de ARNi de VP28, provee una protección contra la infección experimental de WSSV en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Palabras clave: **WSSV, *Bacillus subtilis*, ARNi, Camarón blanco**

Abstract of the thesis presented by Ana Karina Espinoza Villalva as a partial requirement to obtain the Master degree in Sciences of Life with orientation in Marine Biotechnology.

Generation of a *Bacillus subtilis* strain as model of expression of RNA of viral proteins for the control of the white spot syndrome virus.

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Olmos Soto

Mexico is ranked number 4 within the main countries aquaculture producers in Latin America and the Caribbean. In Mexico, there are 402 farms (45 thousand Ha) intended for the cultivation of shrimp, located in Sonora, Sinaloa and Nayarit. One of the major problems in shrimp farming is the impact of caused by viral pathogens. The White Spot Syndrome Virus (WSSV) is currently the shrimp viral pathogen most lethal at the worldwide. The potential of the RNA interference (RNAi) is being explored as therapeutic treatment of viral infections. Recent studies suggest the use of prokaryotic expression systems for the control of WSSV. *Bacillus subtilis* is a bacterium Gram (+), non-pathogenic, recognized as GRAS (Generally Recognized As Safe) by the FDA, with activity probiotics and ability to grow in a simple and non-expensive medium, makes it an ideal candidate for the production of heterologous antigens and their use in the production of vaccines. Was generated a *Bacillus subtilis* strain containing the information for express RNAi of the gene protein VP28 of WSSV and their protective capacity was evaluated against WSSV infection. The organisms which were provided with the *Bacillus* strain survived the infection for a long-time. The present study shows that oral administration of pellets coated with recombinant *Bacillus subtilis* strain, provides protection against experimental challenge of WSSV in shrimp *Litopenaeus vannamei*.

**Keywords:** WSSV, *Bacillus subtilis*, RNAi, shrimp

## Dedicatorias

A mi inspiración diaria, mi familia.

A mi propósito diario de ser feliz.

A mi libertad,  
por romper el velo del miedo al cambio  
que nubla la mente y limita experiencias.

## Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por su cariño y apoyo incondicional, por siempre preguntar ¿cómo están los camarones? A mis padres Salvador y Ana Berta, mis hermanos Salvador, Carolina y Román Alberto, por su ejemplo de amor, respeto, trabajo y lucha por lo que uno quiere. Por recordarme día con día que ante todo siempre estarán conmigo. Sé que estoy lejos de casa pero siempre están en mis pensamientos.

Agradezco al CICESE así como al Posgrado de Ciencias de la Vida, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, pero aún más agradezco a Adriana Mejía secretaria del Posgrado, que siempre estuvo ahí para ayudarnos.

Agradezco al CONACyT, por el financiamiento otorgado a través de la beca de manutención. Agradezco al Dr. Jorge Olmos, dejarme formar parte de su grupo de trabajo y por la enseñanza y el apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Al comité conformado por el Dr. Jesús Paniagua y el Dr. Israel Martínez, por sus observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Olga Callejas y Dra. Nallely Cano del Dpto. de Microbiología, Dr. Alejandro Huerta del CNyN-UNAM, Dra. Ivone Giffard de la UABC y al técnico Ernesto Lerma del Dpto. de Biotecnología Marina por su valioso tiempo y apoyo en el laboratorio.

Jonathan, no hay forma que pueda expresar mi gratitud por todo el apoyo que me has dado este tiempo. Gracias por tu cariño y paciencia, por recordarme que si se quiere se puede. A mi amiga Lluvia, muchísimas gracias por todos los buenos y difíciles momentos que pasamos juntas, Oh! Lluvia! Llegaste a mi vida bailando!. A mis compañeros de laboratorio: Christian, Rosalinda y Silvia; a mis vecinos: Diego, Ceci, Gerardo, Oscar, Paola y Alex, por estar ahí en la forma particular de cada uno de ustedes, muchísimas gracias por su amistad y enseñanzas. A mis amigas Lupita, Mony, Mary, Lili y Era, aunque estemos lejos siempre han estado pendiente con sus consejos y aliento para mejorar día con día, las recuerdo con mucho cariño.

## Contenido

|                                                                          | Página |
|--------------------------------------------------------------------------|--------|
| Resumen español.....                                                     | ii     |
| Resumen inglés.....                                                      | iii    |
| Dedicatorias.....                                                        | iv     |
| Agradecimientos.....                                                     | v      |
| Lista de Figuras.....                                                    | viii   |
| Lista de Tablas.....                                                     | x      |
| Capítulo 1. Introducción                                                 |        |
| 1.1    Antecedentes.....                                                 | 2      |
| 1.1.1    Virus de la Mancha Blanca .....                                 | 2      |
| 1.1.2    Genoma, Clasificación y Morfología.....                         | 2      |
| 1.1.3    Proteínas Virales.....                                          | 3      |
| 1.1.4    Búsqueda de Estrategias para el Control de la Infección.....    | 3      |
| 1.1.5 <i>Bacillus subtilis</i> .....                                     | 5      |
| 1.1.6    Gen <i>sacB</i> .....                                           | 6      |
| 1.2    Justificación.....                                                | 7      |
| 1.3    Hipótesis.....                                                    | 8      |
| 1.4    Objetivos.....                                                    | 8      |
| 1.4.1    Objetivo general.....                                           | 8      |
| 1.4.2    Objetivos específicos.....                                      | 8      |
| Capítulo 2. Metodología                                                  |        |
| 2.1    Cepas y plásmidos.....                                            | 9      |
| 2.2    Diseño de oligonucleótidos y enzimas de restricción.....          | 11     |
| 2.3    Amplificación de fragmentos por PCR.....                          | 12     |
| 2.4    PCR sobrelapante.....                                             | 13     |
| 2.5    Purificación de fragmentos de gel de agarosa.....                 | 15     |
| 2.6    Construcción del plásmido pGEM-F a partir de F y pGEM®.....       | 15     |
| 2.7    Construcción del plásmido pDGF a partir de pGEM-F y pDG1662.....  | 16     |
| 2.8    Transformación de <i>Bacillus subtilis</i> .....                  | 18     |
| 2.9    Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> .....            | 19     |
| 3.0    Preparación de alimento de camarón.....                           | 19     |
| 3.1    Bioensayo de infección con WSSV.....                              | 20     |
| 3.1.1    Activación del WSSV.....                                        | 20     |
| 3.1.2    Animales experimentales.....                                    | 20     |
| 3.1.3    Bioensayo.....                                                  | 21     |
| Capítulo 3. Resultados                                                   |        |
| 3.1    Amplificación de fragmento <i>sacB</i> y <i>vp28</i> por PCR..... | 22     |
| 3.2    PCR sobrelapante.....                                             | 22     |
| 3.3    Construcción de pGEM-F.....                                       | 23     |
| 3.4    Construcción de pDGF.....                                         | 24     |

|                                 |                                                                   |    |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5                             | Transformación de <i>Bacillus subtilis</i> .....                  | 26 |
| 3.6                             | Curvas de crecimiento de las cepas <i>Bacillus subtilis</i> ..... | 28 |
| 3.7                             | Alimento de camarón recubierto con la vacuna.....                 | 29 |
| 3.8                             | Bioensayo.....                                                    | 29 |
| Capítulo 4. Discusión           |                                                                   |    |
| 4.1                             | Discusiones.....                                                  | 31 |
| Conclusiones.....               |                                                                   | 34 |
| Perspectivas.....               |                                                                   | 35 |
| Referencias bibliográficas..... |                                                                   | 36 |
| Anexo.....                      |                                                                   | 41 |

## Lista de figuras

| Figura |                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Página |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Virus de la Mancha Blanca. a) Representación esquemática del WSSV, b) Imagen de microscopia electrónica que muestra los viriones de WSSV con los apéndices. Escala de la barra=250 nm (Durand <i>et al.</i> 1996).....                                                                         | 3      |
| 2      | <i>Bacillus subtilis</i> , bacteria en forma de bastón.....                                                                                                                                                                                                                                    | 5      |
| 3      | Características del vector pGEM®-T. Vector para clonar productos de PCR, contiene el ORI para <i>E. coli</i> y el gen de resistencia a Ampicilina...                                                                                                                                           | 10     |
| 4      | Plásmido pDG1662. Vector de integración al gen <i>amy</i> del cromosoma de <i>Bacillus subtilis</i> .....                                                                                                                                                                                      | 11     |
| 5      | Electroforesis de los productos de PCR amplificados. M, Marcador de Peso Molecular de 450, 700 y 1100 pb, 1) <i>sacB</i> de 300 pb, 2) Control Negativo de <i>sacB</i> , 3) <i>vp28</i> de 615 pb, 4) Control Negativo de <i>vp28</i> .....                                                    | 22     |
| 6      | Fusión <i>sacB::vp28</i> (F). a) Representación esquemática de la fusión <i>sacB::vp28</i> (F), b) Electroforesis. Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, 1) F de 915 pb, 2) <i>vp28</i> de 615 pb y 3) <i>sacB</i> de 300 pb..                                                     | 23     |
| 7      | Representación esquemática de pGEM-F.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 23     |
| 8      | Electroforesis de productos de PCR del fragmento F. Productos de PCR a partir de ADN plasmídico de las colonias F1, F2 y F3. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (-) Control negativo y (+) Control positivo.....                                                             | 24     |
| 9      | Electroforesis de la digestión de pGEM-F y pDG1662 con las enzimas de restricción <i>SpHI</i> y <i>Sall</i> . 1) pDG1662 sin digerir, 2) pDG1662 digerido, 3) pGEM-F sin digerir, 4) y 5) pGEM-F digerido, 6) Producto de PCR de 915 pb.....                                                   | 24     |
| 10     | Electroforesis de productos de digestión purificados. Los productos de digestión se purificaron con kit <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> (QIAGEN, USA). 1) Producto de PCR de 915 pb, 2) Fragmento F digerido y purificado, 3) pDG1662 digerido y purificado.....                            | 25     |
| 11     | Representación esquemática del plásmido pDGF. El plásmido pDGF es el resultado de la inserción de la fusión <i>sacB::vp28</i> en pDG1662.....                                                                                                                                                  | 25     |
| 12     | Electroforesis de productos de PCR. Fragmento F a partir de ADN plasmídico de las colonias 1-15. (-) Control negativo, (+) Control positivo, Producto de PCR de 915 pb.....                                                                                                                    | 25     |
| 13     | Tinción de Yodo de las clonas de <i>Bacillus</i> transformadas con pDGF. a) Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> transformada con pDGF sin teñir, b) Tinción del Yodo sobre el almidón, se observa una colonia que presenta un halo de degradación de almidón (marcada por la flecha roja)..... | 27     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 14 | Electroforesis de productos de PCR a partir de ADN cromosomal de las colonias 1-10. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (+) Control Positivo, (-) Control Negativo.....                                                                                                                                                                            | 27 |
| 15 | Electroforesis de los productos de PCR del Fragmento F a partir de ADN cromosomal de las 4 colonias que crecieron en Medio Mínimo-Gli-Trp. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (+) Control Positivo, (-) Control Negativo.....                                                                                                                     | 28 |
| 16 | Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> . a) Cepa de referencia <i>BB80</i> , b) Cepa <i>BB80-18</i> , c) Cepa <i>BB80-19</i> . Se observan la fase exponencial (1) que se presenta de las 2-4 horas de lectura, la fase estacionaria (2) alrededor de las 4 horas, y finalmente la fase de muerte celular (3) con el decaimiento de la lectura de DO..... | 29 |

## Lista de tablas

| Tabla |                                                              | Página |
|-------|--------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | Plásmidos utilizados en el transcurso del trabajo.....       | 9      |
| 2     | Cepas y material biológico utilizado.....                    | 10     |
| 3     | Características de oligonucleótidos.....                     | 12     |
| 4     | Enzimas de restricción.....                                  | 12     |
| 5     | Mezcla de reactivos y condiciones de PCR.....                | 13     |
| 6     | Mezcla de reactivos y condiciones de PCR sobrelapante.....   | 14     |
| 7     | Reacción de ligación de F y pGEM <sup>®</sup> -T.....        | 15     |
| 8     | Reacción de digestión.....                                   | 16     |
| 9     | Reacción de ligación.....                                    | 17     |
| 10    | Registro de organismos vivos tras la infección con WSSV..... | 30     |

## Capítulo 1. Introducción

---

México ocupa el lugar número 4 dentro de los principales países productores de Acuicultura de América Latina y el Caribe con un volumen de producción anual de 144.6 mil toneladas y un valor de producción anual de 472.1 millones de dólares. En los últimos 30 años, la contribución de la Acuicultura ha aumentado de 0.1 al 9.6 % de la producción pesquera regional. Se estimó que para el 2012 más del 50 por ciento del consumo global de alimentos acuáticos se originaría de la Acuicultura (FAO, 2010).

En México existen 402 granjas (45 mil Ha) destinadas al cultivo de camarón, ubicadas en Sonora, Sinaloa y Nayarit (Molina *et al.*, 2007). Aun cuando el cultivo de camarón presenta un crecimiento acelerado, uno de los problemas más importantes de la acuicultura, es el impacto de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, parásitos y virus. Las enfermedades provocadas por patógenos virales causan mortalidades elevadas y severas pérdidas económicas. Estas pérdidas incluyen; alta tasa de mortalidad, la interrupción de los ciclos de producción, aumentos de gastos de producción y las deformaciones en los individuos sobrevivientes que no son aptos para la comercialización (Jiménez *et al.*, 2005).

El virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) es un virus de ADN de doble cadena circular de alrededor de 300 kpb, pertenece a la familia *Nimaviridae* (Vlak *et al.*, 2005). Actualmente es el patógeno viral del camarón más letal a nivel mundial, puede ocasionar 100% de mortalidad de 7 a 10 días (Lightner, 1996; Sánchez, 2010).

El potencial del ARN de interferencia (ARNi) está siendo explorado como tratamiento terapéutico de infecciones virales (Lu *et al.*, 2005; Tan y Yin, 2004). El enfoque basado en ARNi tiene gran relevancia en el camarón, debido a que a diferencia de otras estrategias de vacunación, este mecanismo de acción es independiente de la presencia o ausencia de respuesta inmune específica en el animal (Krishnan *et al.*, 2009). La falta de un sistema inmune adaptivo en el camarón dificulta el desarrollo de una vacuna contra el virus, sin embargo, estudios recientes sugieren el uso de sistemas de expresión procariotas para el control del WSSV.

*Bacillus subtilis* es un organismo no patógeno reconocido como seguro por la FDA. Cuenta con actividad probiótica, crece en medios simples y económicos. Por lo tanto, es un candidato ideal para la producción de antígenos heterólogos para su uso en la producción de vacunas.

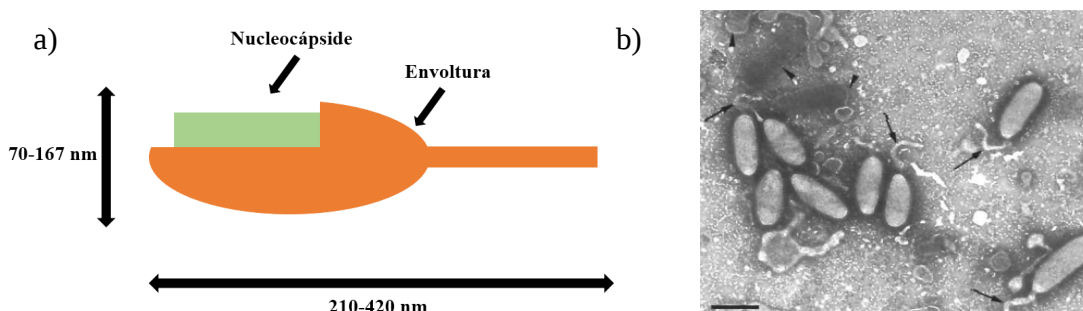
## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Virus de la mancha blanca**

El virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) fue detectado por primera vez en Taiwán en 1992 y después se extendió a Japón y casi todos los países asiáticos. El primer caso diagnosticado de WSSV en América fue en Texas en 1995. Es uno de los virus más letales que infecta a camarones *Peneidos*, es un patógeno con una replicación rápida y virulenta que puede ocasionar 100% de mortalidad de 7 a 10 días, una vez que se han presentado los signos clínicos de la enfermedad (Lightner, 1996; Sánchez, 2010). Los signos clínicos de la enfermedad incluyen; nado errático, letargia, cutícula blanda, disminución del consumo de alimento, coloración rojizas de apéndices y manchas blancas sobre el exoesqueleto. Este patógeno es reconocido a nivel mundial como el patógeno más letal en el cultivo de camarón (Escobedo *et al.*, 2008).

### **1.1.2 Genoma, clasificación y morfología**

El WSSV pertenece al género *Whispovirus* y la familia *Nimaviridae* (Vlak *et al.*, 2005), cuenta con un genoma de ADN de doble cadena circular de alrededor de 300 kpb. Es un virus envuelto con forma de bacilo y cuenta con un apéndice tipo cola, que es una larga extensión de la envoltura en un extremo del virión (Durand *et al.*, 1996) (Fig. 1a). Mide de 210-420 nm de largo y 70-167nm de diámetro. La envoltura viral es de 6-7 nm de grueso y tiene la estructura de una bicapa lipídica, con un área entre la envoltura y la nucleocápside que varía entre 2 y 7.5 nm. Las dimensiones de la nucleocápside son 180-420nm de largo y 54-85 nm de diámetro, indicando que es firmemente empaquetada con el virión (Fig. 1b).



**Fig.1. Virus de la Mancha Blanca. a) Representación esquemática del WSSV, b) Imagen de microscopia electrónica que muestra los viriones de WSSV con los apéndices. Escala de la barra=250 nm (Durand *et al.* 1996, pag. 61).**

### 1.1.3 Proteínas virales

El análisis de secuencias muestra que el genoma del WSSV contiene entre 531 y 684 open reading frames (ORFs), de los cuales 181-184 codifican para proteínas funcionales (Yang *et al.*, 2001). La envoltura viral consiste en por lo menos 35 diferentes proteínas (Lin *et al.*, 2001), de las cuales VP26 y VP28 son las más abundantes, representando aproximadamente el 60% de la envoltura (Tang *et al.*, 2007).

VP26 está localizada en el espacio entre la envoltura y la nucleocápside y actúa como proteína de unión. Estudios indican que VP26 es el principal componente de la nucleocápside viral, puede ayudar al WSSV a moverse hacia el núcleo por la interacción con actina o la unión a proteínas celulares de unión a actina (Xie y Yang, 2005).

VP28 es codificada por el ORF421 y es la principal proteína de la envoltura. Estudios sugieren que VP28 juega un rol crucial en el paso inicial de la infección del WSSV en el camarón (Van *et al.*, 2007) y en el proceso de infección como proteína de unión; uniendo el virus a la célula del camarón y ayudándolo a ingresar al citoplasma (Yi *et al.*, 2004).

### 1.1.4 Búsqueda de estrategias para el control de la infección

Las infecciones virales son una de las causas principales de pérdidas millonarias en el cultivo de camarón (Mudagandur y Yuanan, 2009). El éxito en la infección viral por el WSSV se debe principalmente a que puede infectar a un amplio rango de hospederos crustáceos y no

crustáceos (Sánchez, 2010). El impacto grave que causa el WSSV en el cultivo de camarón y debido a que no existe un tratamiento comercial adecuado contra la enfermedad, ha generado la búsqueda de alternativas que contrarresten las severas pérdidas económicas ocasionadas. La falta de un sistema inmune adaptivo en el camarón dificulta el desarrollo de una vacuna contra el virus, sin embargo, estudios recientes sugieren el uso de sistemas de expresión procariotas para el control de WSSV.

El potencial del ARN de interferencia (ARNi) está siendo explorado como tratamiento terapéutico de infecciones virales (Lu *et al.*, 2005; Tan y Yin, 2004). El ARNi es un mecanismo celular que es iniciado por ARN de doble cadena (dsARN) y resulta en la degradación secuencia-específica del ARN blanco (Fire *et al.*, 1998). Este mecanismo de silenciamiento gen-específico, el cual es universalmente conservado, existe en muchos organismos eucariotas incluyendo invertebrados (Brown *et al.*, 2003; Denli y Hannon, 2003). El silenciamiento gen-específico de ácidos nucleicos virales se puede llevar a cabo por la introducción de dúplex de 21-23 nucleótidos de ARN sintético (Elbashir *et al.*, 2001) o por la transcripción de un constructo de interés (Brummelkamp *et al.*, 2002), provocando el silenciamiento de genes de patógenos virales, induciendo así una respuesta antiviral a nivel molecular. El enfoque basado en ARNi tiene gran relevancia en el camarón, debido a que a diferencia de otras estrategias de vacunación, este mecanismo de acción es independiente de la presencia o ausencia de respuesta inmune específica en el animal (Krishnan *et al.*, 2009).

Kim y colaboradores en el 2007 realizaron la inyección intramuscular de dsARN sintetizado *in vitro* que codifica la proteína GFP y las proteínas VP28, VP281 y proteína cinasa (PK) del WSSV a *Penaeus chinensis*. Estos autores reportan altas tasas de supervivencia en camarones inyectados con dsARN, incluyendo GFP, indicando una inmunidad antiviral secuencia-independiente, como había sido reportado anteriormente. Sarathi y colaboradores en el 2007 desarrollaron un sistema de expresión *in vivo* en *E. coli* HT115 (DE3) y reportan una supervivencia del 100% en *Penaeus monodon* desafiados con WSSV posterior a la inyección intramuscular del dsARN del gen *vp28* del WSSV. Posteriormente en el 2008, estos autores describen la administración oral de este sistema de expresión como una posibilidad de protección de *Penaeus monodon* contra WSSV. La metodología incluyó dos experimentos; el primero consistió en la administración oral de alimento comercial suplementado con la cepa inactivada de *E. coli* HT115 (DE3) productora de dsARN del gen *vp28*, reportando una supervivencia posterior al desafío con WSSV del 68%. El segundo

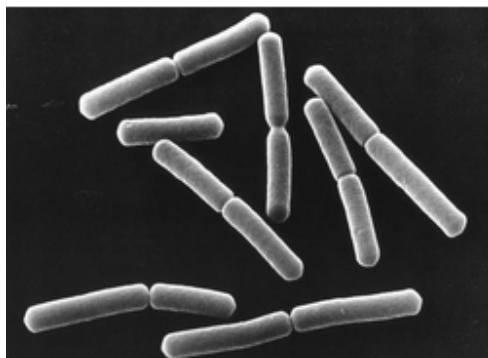
consistió en la administración oral de alimento comercial suplementado con un complejo de quitosano-dsARN del gen *vp28*, reportando una supervivencia posterior al desafío del 37%.

Krishnan y colaboradores en el 2009, transformaron *E. coli DH5α* un plásmido capaz de expresar ARN de horquilla larga (hlARN), con la habilidad para reducir la carga viral de WSSV en *Penaeus monodon*. El hlARN fue administrado por inyección intramuscular en el animal y reportan una supervivencia mayor al 50% en camarones inyectados con el constructo que contenía el gen *vp28* y del 29% y 22% para los genes *vp19* y *GFP*, respectivamente.

A pesar de los resultados exitosos obtenidos en los estudios anteriores, debido a la cantidad de animales que se manipulan en las granjas de cultivo de camarón, la inyección intramuscular se convierte en un mecanismo impráctico. Aunado a que el desarrollo de los sistemas de expresión descritos es muy costoso y utilizan bacterias que son reconocidas como enteropatógenas por la FDA y su equivalente mexicano SSA-Subsecretaria de Regulación y Fomento Sanitario. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de alternativas prácticas, seguras y económicamente viables para el desarrollo de un mecanismo de vacunación que le confiera al camarón inmunidad y mayor sobrevivencia a la infección causada por WSSV.

#### 1.1.5 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria generalmente reconocida como segura por la FDA. Es Gram (+) y es industrialmente importante (Harwood y Moszer, 2002). Ésta y otras especies de *Bacillus* son usadas en procesos industriales como la producción de enzimas, vitaminas y otros compuestos bioquímicos (Harwood, 1992), por lo que se ha mejorado el conocimiento de sus características fisiológicas y moleculares.



**Fig. 2. *Bacillus subtilis*, bacteria en forma de bastón.**

*Bacillus subtilis* es la bacteria Gram (+) mejor caracterizada, su genoma está formado por 4, 214, 810 pb. Es una bacteria aerobia con forma de bastón (Fig. 2) y que en condiciones adversas forma esporas. Es comúnmente encontrada en suelo, agua y en asociación con plantas (Arellano y Olmos, 2002). Es una fuente importante de enzimas industriales, como amilasas, proteasas y sacarasas y gran parte del interés comercial de esta bacteria recae en su capacidad de secreción de estas enzimas al medio (Kunst *et al.*, 1997). Ha sido utilizada para el estudio de secreción de proteínas y el desarrollo de un hospedero para la producción de proteínas heterólogas (Harwood, 1992; Olmos y Contreras, 2003).

Bajo condiciones de inanición esta bacteria detiene su crecimiento y genera respuestas que incluyen la inducción de motilidad y quimiotaxis, la producción de hidrolasas (proteasa y carbohidrasas) y antibióticos (Olmos *et al.*, 1996; 1997; Sánchez y Olmos, 2004). Si esta respuesta falla en restablecer el crecimiento, las células son inducidas a formar endosporas resistentes a químicos, radiación y desecación.

*B. subtilis* ha sido explorada como una herramienta de expresión y liberación de proteínas recombinantes (Olmos y Contreras, 2003; Ferreira *et al.*, 2005) debido a que:

1. No es patógena y es reconocida como un organismo GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA.
2. Crece en medios simples y económicos.
3. Sistemas de expresión caracterizados.
4. Sus características probióticas le permiten actuar como adyuvante en la vacunación (Ochoa y Olmos, 2006; Olmos *et al.*, 2011).
5. La capacidad de secretar proteínas biológicamente activas las cuales, pueden facilitar la presentación de antígenos y estimular la respuesta del hospedero.

#### **1.1.6 Gen *sacB***

El gen *sacB* de *B. subtilis* codifica para la enzima levansacarasa (2,6- $\beta$ -D-EC 2.4.1.10) que es secretada al medio de cultivo. La enzima cataliza la hidrólisis de sacarosa y la síntesis de polímeros de fructosa de alto peso molecular conocidos como levan (Pelicic *et al.*, 1996). La secuencia codificadora de *sacB* es precedida de una región reguladora de 400pb llamada *sacR* que contiene el promotor y regiones blanco de varios reguladores (Aymerich *et al.*, 1986; Jager *et al.*, 1992).

La necesidad de una regulación estricta y una inducción barata ha generado el interés en los elementos reguladores del catabolismo de sacarosa en *B. subtilis*. La regulación de *sacB* es compleja e involucra la activación de varios componentes que actúan de manera positiva. El promotor de *sacB* es moderadamente fuerte, su expresión es constitutiva y es normalmente limitada a la fase de crecimiento (Mountain, 1989). Análisis del metabolismo de sacarosa en *B. subtilis* ha llevado a la identificación de mutaciones pleiotrópicas, *degU32(Hy)* es un ejemplo de estas, ya que afecta no sólo la síntesis de levansacarasa si no también la síntesis de otros genes de productos secretados (Shimotsu y Henner, 1986). Cepas de *B. subtilis* que acarrean la mutación *degU32(Hy)* sobreproducen varias enzimas degradativas y son deficientes en la motilidad y competencia (Aymerich *et al*, 1986; Olmos *et al*, 1997). La mutación *degU32(Hy)* incrementa los niveles de expresión de *sacB* y la regula de manera positiva por medio de la unión a la región del promotor (Aymerich *et al*, 1986; Shimotsu y Henner, 1986; Klier *et al*, 1987; Tsukahara y Mitsuo, 2008).

A pesar del amplio conocimiento del genoma, sistemas de expresión y las ventajas con las que cuenta *B. subtilis* sobre otros organismos, existe poca información sobre su potencial aplicación como vacuna.

## 1.2 Justificación

Dentro de la acuicultura, el cultivo de camarón es una de las áreas con mayor importancia económica y la que presenta mayor crecimiento. Debido a los graves problemas y las pérdidas económicas que ocasiona el virus de la mancha blanca resulta necesaria la búsqueda de alternativas prácticas, seguras y económicamente viables para el desarrollo de un mecanismo de vacunación capaz de prevenir y controlar la infección causada por el WSSV. Las características que presenta *Bacillus subtilis* lo convierten en una herramienta potencial para el desarrollo de un modelo de expresión de ARN de proteínas virales y su aplicación en el control de la infección del virus de la mancha blanca.

### 1.3 Hipótesis

La supervivencia del camarón frente a la infección del virus de la mancha blanca será mayor por el suministro en el alimento, de una cepa de *Bacillus subtilis* productora de ARN de interferencia del gen de la proteína VP28 del virus de la mancha blanca.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Prevenir la infección del virus de la mancha blanca en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mediante la generación de una cepa de *B. subtilis* productora de RNA de interferencia del gen de la proteína viral VP28.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Amplificar y fusionar en fase el promotor del gen *sacB* de *B. subtilis* y el gen *vp28* del virus de la mancha blanca para la producción de ARN de interferencia en *B. subtilis*.
- Construir un vector para integrar la fusión y establecer la expresión de ARN del gen *vp28* en el cromosoma de *B. subtilis*.
- Evaluar la capacidad protectora del ARN de interferencia en camarones desafiados con el virus de la mancha blanca.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Cepas y plásmidos

En la Tabla 1 se muestran los plásmidos utilizados en el presente trabajo. Estos fueron transformados en *E. coli DH5α* para su purificación y mantenimiento. Los plásmidos purificados fueron resuspendidos en Buffer TE y se mantuvieron a -20°C. En la Tabla 2 se muestran las cepas y material biológico utilizado en el presente trabajo. Las cepas fueron resguardadas en un cepario a -70°C con glicerol al 30%. El WSSV fue proporcionado en camarones infectados con WSSV por la Dra. Ivone Giffard, UABC, Facultad de Ciencias Marinas.

En la Figura 3 se muestra una imagen con las características del vector pGEM®-T, el cual se utilizó para clonar el producto de PCR sobrelapante de la fusión del promotor de *sacB* con el gen *vp28* (fragmento F).

En la Figura 4 se muestra un esquema con las características del plásmido de integración pDG1662 de *Bacillus subtilis*. El plásmido pDG1662 es un plásmido de integración al cromosoma de *B. subtilis*, confiere resistencia a cloranfenicol (Cm), debido a que la región de recombinación en *amy* contiene el gen de resistencia a cloranfenicol. Además de la selectividad a partir de las colonias que no presentan actividad de la amilasa, como consecuencia de la inactivación del gen *amy*, al insertarse el fragmento de interés por recombinación homóloga doble. Dicho plásmido se utilizó como vector para integrar la fusión *sacB::vp28* (F) en el genoma *amy* de *Bacillus subtilis*.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en el transcurso del trabajo.

| Plásmido | Descripción                                                                                      | Fuente              |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| pGEM®-T  | Plásmido para clonar productos de PCR                                                            | Promega, Co.        |
| pGEM-F   | Plásmido donde se clonó la fusión <i>sacB::vp28</i> y con el cual se transformó <i>E. coli</i>   | Presente trabajo    |
| pDG1662  | Plásmido de integración para <i>Bacillus subtilis</i>                                            | CICESE <sup>1</sup> |
| pDGF     | Fusión <i>sacB::vp28</i> clonada en pDG1662 y con el cual se transformó <i>Bacillus subtilis</i> | Presente trabajo    |

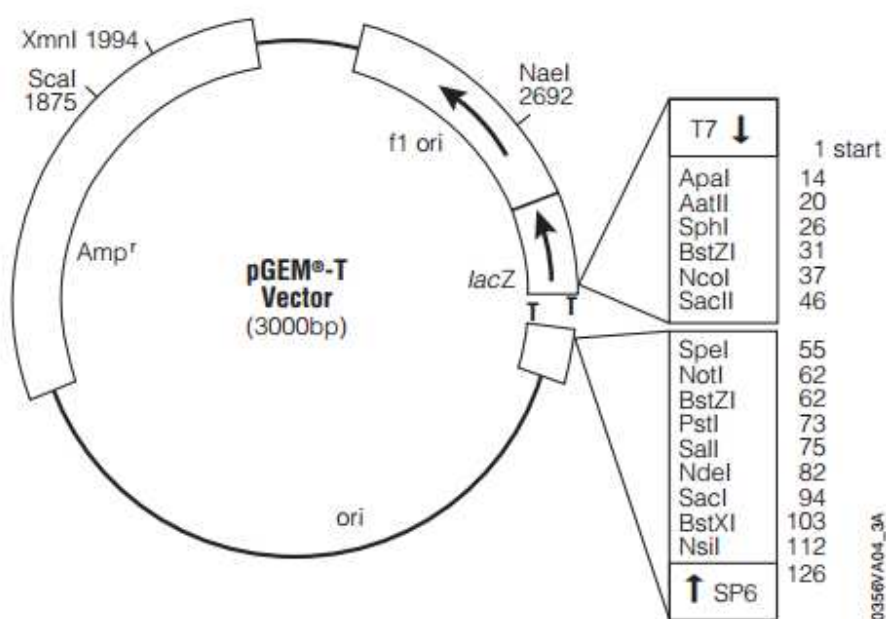
<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular. Depto. de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Tabla 2. Cepas y material biológico utilizado.

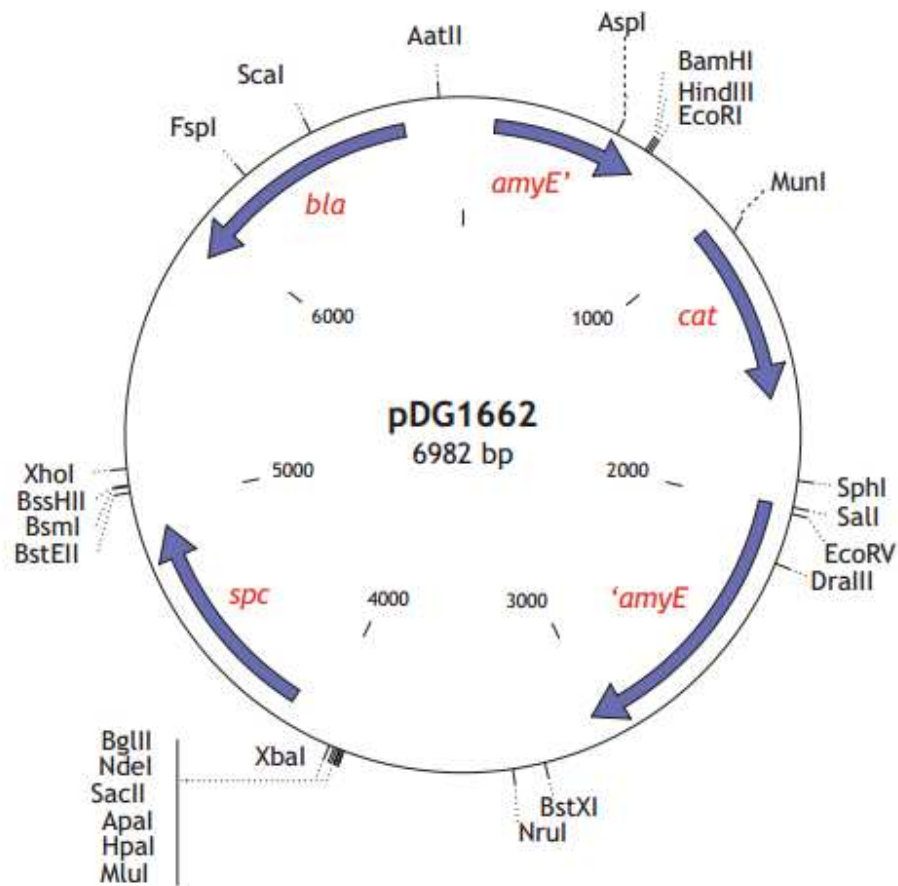
| Especie            | Cepa    | Genotipo                   | Fuente              |
|--------------------|---------|----------------------------|---------------------|
| <i>B. subtilis</i> | BB80    | <i>his gly trp</i>         | CICESE <sup>1</sup> |
| <i>B. subtilis</i> | BB80-17 | <i>gly trp degU32</i>      | CICESE <sup>1</sup> |
| <i>B. subtilis</i> | BB80-18 | <i>his gly trp pDGF</i>    | Presente trabajo    |
| <i>B. subtilis</i> | BB80-19 | <i>gly trp pDGF degU32</i> | Presente trabajo    |
| <i>E. coli</i>     | DH5α    | -                          | CICESE <sup>1</sup> |
| <i>E. coli</i>     | DH5α-2  | pDG1662                    | Presente trabajo    |
| <i>E. coli</i>     | DH5α-3  | pGEM-F                     | Presente trabajo    |
| <i>E. coli</i>     | DH5α-4  | pDGF                       | Presente trabajo    |
| WSSV               | -       | -                          | UABC <sup>2</sup>   |

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular. Depto. de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

<sup>2</sup>Dra Ivone Giffard Mena. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.



**Figura 3. Características del vector pGEM®-T. Vector para clonar productos de PCR, contiene el ORI para *E. coli* y el gen de resistencia a Ampicilina.**



**Figura 4. Plásmido pDG1662. Vector de integración al gen *amy* del cromosoma de *Bacillus subtilis*.**

## 2.2 Diseño de oligonucleótidos y enzimas de restricción

El gen de *vp28* fue seleccionado porque VP28 es la principal proteína de envoltura que está involucrada en el proceso de infección del camarón (Sánchez-Paz, 2010). El promotor de *sacB* se seleccionó porque es un promotor moderadamente fuerte y es el blanco de la regulación positiva por la mutación *degU32* en *Bacillus subtilis*. En la Tabla 3 se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar el fragmento del promotor de *sacB* de *Bacillus subtilis* y el gen *vp28* del virus de la mancha blanca. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el software SnapGene (SnapGene® Viewer 2.1, GSL Biotech LLC, disponible en <http://www.snapgene.com> (consultado en Octubre del 2012) tomando como base las secuencias publicadas en GeneBank. Se consultó el

NCBI (National Center for Biotechnology Information) con número de acceso AF502435 para el gen *vp28* del virus de la mancha blanca y NC\_000964 para el promotor de *sacB*.

En la Tabla 4 se describen las enzimas de restricción utilizadas, su secuencia de reconocimiento y patrón de corte.

Tabla 3. Características de oligonucleótidos. Las letras en rojo indican los sitios de corte de las enzimas de restricción o los sitios de hibridación del PCR sobrelapante.

| Nombre | Secuencia (5'- 3')                       | Longitud (ntc) | Tm (°C) | Enzima de restricción/Secuencia de hibridación |
|--------|------------------------------------------|----------------|---------|------------------------------------------------|
| FS     | acatgcatgccctgccgttcactattatttagtg       | 31             | 56      | SpH I                                          |
| RSVP28 | agtgaagaaagatccatcagtaacaaacccgcgc       | 36             | 56      | Primeros 18 nucleótidos de <i>vp28</i>         |
| FVP28S | gcgcgggtttgttactgaatggatctttcttcactcttcg | 42             | 56      | Últimos 18 nucleótidos de promotor <i>sacB</i> |
| RVP28  | acgcgtcgacttactcgggtctcagtgccca          | 29             | 56      | Sal I                                          |

Tabla 4. Enzimas de restricción.

| Enzima | Secuencia (5'- 3') | Patrón de corte                        |
|--------|--------------------|----------------------------------------|
| SpH I  | GCATGC             | 5'- GCATG / C -3'<br>3'- C / GTACG -5' |
| Sal I  | GTCGAC             | 5'- G / TCGAC -3'<br>3'- CAGCT / G -5' |

## 2.3 Amplificación de fragmentos por PCR

La amplificación de los fragmentos se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µL, los reactivos y condiciones del PCR se indican en la Tabla 5. La amplificación se llevó a cabo en termociclador Bio-RAD iClycler. La polimerasa utilizada fue extraída en el Laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en IDT y resuspendidos en Buffer TE a una concentración 1 µg/µL (Solución Stock), se preparó una dilución 1:5 en H<sub>2</sub>O para obtener una solución de trabajo de 200ng/ µL.

Para la amplificación del promotor de *sacB* de *Bacillus subtilis* (*sacB*) se utilizaron los oligos: FS (sentido), agregándole en el extremo 5' un sitio de corte para SpH I; y el oligo RSVP28

(antisentido), agregándole en su extremo 5' un sitio de hibridación a los primeros 18 nucleótidos de *vp28*, para amplificar un fragmento esperado de 300 pb. Como templado se utilizó ADN cromosomal de *Bacillus subtilis* purificado por el protocolo indicado en el Anexo 1, Protocolo I.

Para la amplificación del gen *vp28* del WSSV (*vp28*) se utilizaron los oligos: FVP28S (sentido), agregándole en el extremo 5' un sitio de hibridación para los últimos 18 nucleótidos del promotor de *sacB*; y el oligo RVP28 (antisentido), agregándole en su extremo 5' un sitio de corte para *Sal I*, para amplificar un fragmento esperado de 615 pb. Como templado se utilizó ADN viral purificado anteriormente en el Laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos.

Tabla 5. Mezcla de reactivos y condiciones de PCR.

| Reactivo                   | Cantidad | Programa PCR |                              |    |        |
|----------------------------|----------|--------------|------------------------------|----|--------|
| Buffer 10X*                | 5.0 µL   | 30<br>ciclos | Desnaturalización<br>inicial | °C | Tiempo |
| MgCl <sub>2</sub> 50mM*    | 1.5 µL   |              |                              | 95 | 5 min  |
| dNTP's 10mM*               | 1.0 µL   |              |                              |    |        |
| Oligo sentido 200ng/µL     | 1.0 µL   |              |                              |    |        |
| Oligo antisentido 200ng/µL | 1.0 µL   |              | Desnaturalización            | 95 | 1 min  |
| Taq polimerasa             | 2.0 µL   |              | Alineamiento                 | 56 | 1 min  |
| H <sub>2</sub> O           | 36.5 µL  |              | Extensión                    | 72 | 1 min  |
| ADN templado               | 2 µL     |              | Extensión final              | 72 | 10 min |

\*Invitrogen, Co.

Para la visualización de los productos de PCR, se cargaron 5 µL en un Gel de Agarosa al 1.2% en Buffer TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio.

Los productos de PCR fueron purificados por el protocolo indicado en el Anexo 1, Protocolo VI para su posterior uso en el PCR sobrelapante.

## 2.4 PCR sobrelapante

Se realizó un PCR sobrelapante con el objetivo de fusionar en fase al fragmento *sacB*, de 300 pb, con *vp28*, de 615 pb, y obtener el fragmento *sacB::vp28* denominado fusión (F) de 915 pb. El fragmento F contiene dos sitios de corte, uno para la enzima *SpH I* en el extremo 5' y otro para

la enzima Sal I en el extremo 3' (Figura 6a). El PCR sobrelapante consta de dos etapas, en la primera fase, no se adicionan oligonucleótidos a la mezcla con el objetivo de fusionar los fragmentos de interés. En una segunda fase, se agregan a la mezcla los oligonucleótidos correspondientes para amplificar el fragmento fusionado. En la Tabla 6 se indican los reactivos y condiciones del PCR sobrelapante.

Tabla 6. Mezcla de reactivos y condiciones de PCR sobrelapante.

| Etapa 1                   |          |                 |                           |    |        |
|---------------------------|----------|-----------------|---------------------------|----|--------|
| Reactivo                  | Cantidad | Programa de PCR |                           |    |        |
| Buffer 10X*               | 5.0 µL   |                 |                           |    |        |
| MgCl <sub>2</sub> 50mM*   | 1.5 µL   |                 |                           | °C | Tiempo |
| dNTP's 10mM*              | 1.0 µL   | 10<br>ciclos    | Desnaturalización inicial | 95 | 5 min  |
| Fragmento sacB purificado | 2.0 µL   |                 | Desnaturalización         | 95 | 1 min  |
| Fragmento VP28 purificado | 2.0 µL   |                 | Extensión                 | 72 | 2 min  |
| Taq polimerasa            | 2.0 µL   |                 | Extensión final           | 72 | 10 min |
| H <sub>2</sub> O          | 36.5 µL  |                 | -                         | 4  | ∞      |
| Etapa 2                   |          |                 |                           |    |        |
| Reactivos                 | Cantidad |                 | Desnaturalización inicial | 95 | 5 min  |
|                           |          | 13 ciclos       | Desnaturalización         | 95 | 1 min  |
| Mezcla de Etapa 1         | 50 µL    |                 | Alineamiento              | 56 | 1 min  |
| Oligo FS 200ng/ µL        | 1 µL     |                 | Extensión                 | 72 | 3 min  |
| Oligo RVP28 200ng/µL      | 1 µL     |                 | Extensión final           | 72 | 10 min |

\*Invitrogen, Co.

Los productos de PCR sobrelapante fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.2% en Buffer TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio (Figura 6b).

## 2.5 Purificación de fragmentos de gel de agarosa

Se purificó el fragmento F, producto del PCR sobrelapante, directamente del gel de agarosa. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.6 Construcción del plásmido pGEM-F a partir de F y pGEM<sup>®</sup>

pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, Co.) es un vector linealizado con extremos terminales 3' de una sola Timidina (T-overhangs). Las T-overhangs son el sitio de inserción para la eficiente ligación de productos de PCR generados por polimerasas termoestables, como la *Taq pol.* Tiene origen de replicación para *E. coli* y confiere resistencia a Ampicilina.

Para construir el plásmido pGEM-F (Figura 7) se clonó el fragmento F purificado en el vector pGEM<sup>®</sup>-T siguiendo las recomendaciones del fabricante como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Reacción de ligación de F y pGEM<sup>®</sup>-T.

| Reactivo                    | Cantidad |
|-----------------------------|----------|
| Inserto-fragmento F         | 3 µL     |
| Vector-pGEM <sup>®</sup> -T | 1 µL     |
| T4 DNA Ligase               | 1 µL     |
| 2X Rapid Ligation Buffer    | 5 µL     |
| Volumen total               | 10 µL    |

Se incubó la reacción toda la noche a 4°C. El producto de la reacción de ligación se denominó pGEM-F. Al día siguiente, con el objetivo de multiplicar el número de copias de pGEM-F, se transformó *E. coli DH5α* con 5 µL de pGEM-F, como se indica en el Anexo 1, Protocolo IV. Las células transformadas se sembraron en cajas de Agar LB Miller-Amp<sup>50</sup>-X gal-IPTG y se incubaron a 37°C por 12-24 horas.

Al día siguiente se seleccionaron las colonias blancas y se resembraron en otra placa de Agar LB Miller-Amp<sup>50</sup>-X gal-IPTG para su uso posterior. Simultáneamente, se resembraron en 3

mL de LB Miller-Amp<sup>50</sup>, se crecieron por 6-8 horas a 37°C y 250 rpm para la extracción de ADN plasmídico.

La purificación de ADN plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento indicado en el Anexo 1, Protocolo II.

Se utilizaron 2 µL de ADN plasmídico de cada muestra para su análisis por PCR, utilizando los oligonucleótido FS y RVP28, las condiciones de reacción del PCR se indican en la Tabla 5. Los productos de PCR fueron visualizados en una gel de agarosa al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio (Figura 8).

## 2.7 Construcción del plásmido pDGF a partir de pGEM-F y pDG1662

El vector pDG1662 es un plásmido diseñado para integrar el inserto clonado, por recombinación homóloga doble, dentro del cromosoma de *Bacillus subtilis* en el locus *amyE*. El fragmento de interés es insertado en el sitio de clonación múltiple que cuenta son sitios de corte únicos para diferentes enzimas de restricción. Las cepas transformadas son seleccionadas por su resistencia a cloranfenicol y su incapacidad de degradar almidón agregado al medio.

Para la construcción del plásmido pDGF (Figura 11), que contendrá el fragmento F producto de la fusión *sacB::vp28* y su posterior transformación en *Bacillus subtilis*, se realizó la digestión del plásmido pGEM-F y pDG1662 con las enzimas de restricción SpH I-HF (Biolabs Inc., New England) y Sal I (Biolabs Inc., New England), como se indica en la Tabla 8, llevándolas a un volumen de reacción de 50 µL. Se incubaron 4 horas a 37°C.

Tabla 8. Reacción de digestión.

| Reactivo         | Cantidad |
|------------------|----------|
| ADN plasmídico   | 5 µL     |
| SpH I-HF 20U/µL  | 1 µL     |
| Sal I 20U/µL     | 1 µL     |
| Buffer 4 10X     | 5 µL     |
| BSA 10X          | 5 µL     |
| H <sub>2</sub> O | 33 µL    |
| Volumen total    | 50 µL    |

Posterior a la digestión, las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1 % para la purificación de los productos de interés con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez purificados los fragmentos de interés, fragmento F liberado del plásmido pGEM-F y pDG1662 linealizado, ambos con las secuencias adhesivas únicas en cada extremo generadas por la digestión con las enzimas de restricción; se prosiguió con la ligación de estos para clonar el fragmento F (inserto) en pDG1662 (vector) y obtener el plásmido pDGF.

La reacción de ligación se realizó con T4 DNA Ligasa (Promega Co.) siguiendo las recomendaciones del fabricante como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Reacción de ligación.

| Reactivo            | Cantidad    |
|---------------------|-------------|
| Inserto-fragmento F | 9 $\mu$ L   |
| Vector-pDG1662      | 3 $\mu$ L   |
| T4 DNA Ligase       | 1.5 $\mu$ L |
| Ligase Buffer 10X   | 1.5 $\mu$ L |
| Volumen total       | 15 $\mu$ L  |

Para la reacción de ligación se utilizó la proporción 1:3, vector:inserto, y se incubó a temperatura ambiente (20°C) toda la noche.

El plásmido producto de la reacción de ligación se denominó pDGF. Con el objetivo de aumentar el número de copias de pDGF, se transformó *E. coli DH5 $\alpha$*  con 8  $\mu$ L de pDGF. El procedimiento de transformación se detalla en el Anexo 1, Protocolo IV. Las células transformadas se sembraron en cajas de Agar LB Miller-Amp<sup>50</sup> y se incubaron a 37°C por 12 horas.

Al día siguiente, se resembraron todas las colonias presentes en otra placa de Agar LB Miller-Amp<sup>50</sup> para su uso posterior. Simultáneamente, se resembraron en 3 mL de LB Miller-Amp<sup>50</sup>, se crecieron por 6-8 horas a 37°C y 250 rpm para la extracción de ADN plasmídico.

La purificación de ADN plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento indicado en el Anexo 1, Protocolo II.

Se utilizaron 2  $\mu$ L de ADN plasmídico de cada muestra para su análisis por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos FS y RVP28 y las condiciones de PCR se indicadas en la Tabla 5. Los productos de PCR fueron visualizados en una gel de agarosa al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio (Figura 12).

## 2.8 Transformación de *Bacillus subtilis*

La transformación de *Bacillus subtilis* se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento que se indica en el Anexo 1, Protocolo V. Se realizaron dos transformaciones:

- Transformación 1

Se transformó a la cepa *Bacillus subtilis* BB80 *his gly trp* con 10  $\mu$ L de ADN plasmídico pDGF. Se plaquearon 100  $\mu$ L de las células transformadas en Agar LB-Cm<sup>5</sup> y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al día siguiente, se resembraron todas las colonias en Agar LB-Cm<sup>5</sup>, se incubaron a 37°C por 24 horas y se almacenaron a 4°C para su uso posterior. Simultáneamente, las colonias fueron resembradas en Agar LB-almidón-Cm<sup>5</sup> para evaluar la actividad de  $\alpha$ -amilasa extracelular de la cepa de *Bacillus subtilis* transformada (procedimiento que se indica en el Anexo 1, Protocolo VII).

Se seleccionaron 10 cepas que no degradaron el almidón para la detección del fragmento F en el cromosoma de la cepa transformada, para lo cual, se resembraron en 3 mL de LB-Cm<sup>5</sup>, se crecieron por 6-8 horas a 37°C y 250 rpm para la extracción de ADN cromosomal. Se amplificó el fragmento con los oligos FS y RVP28, esperando la banda de amplificación de 915 pb.

- Transformación 2

En la transformación 2 se co-transformó la cepa *Bacillus subtilis* BB80 *his gly trp* con 10  $\mu$ L de ADN plasmídico pDGF y 10  $\mu$ L de ADN cromosomal de la cepa *Bacillus subtilis* BB80 *degU gly trp*. Se plaquearon 100  $\mu$ L de las células transformadas en Agar LB-Cm<sup>5</sup> y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al día siguiente, se resembraron todas las colonias en Agar LB-Cm<sup>5</sup>, se incubaron a 37°C por 24 horas y se almacenaron a 4°C para su uso posterior. Simultáneamente, las colonias fueron resembradas en Agar LB-almidón-Cm<sup>5</sup> para evaluar la actividad de  $\alpha$ -amilasa extracelular de la cepa de *Bacillus subtilis* transformada y en Medio Mínimo-Gli-Trp para la determinación de las auxotrofías.

## 2.9 Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis*

Para la curva de crecimiento de *B. subtilis* se utilizó un agitador, Thermo Scientific MAXQ 5000, para mantener una agitación y temperatura constante de 250 rpm y 37°C, respectivamente. La densidad óptica (DO) fue leída en un espectrofotómetro marca Hach DR 2800. El protocolo para la Curva de Crecimiento se describe a continuación.

**Activación de la Cepa:** Se sembraron las cepas de interés en Agar LB-Cm<sup>5</sup> y se incubaron a 37°C por 12 horas.

**Cultivo:** Se tomó una colonia aislada, se resembró en 20 mL de LB líquido-Cm<sup>5</sup> y se incubó 12 horas a 37°C y 200 rpm. Posterior a las 12 horas de cultivo, se midió y registró la DO, como fue mayor a 1 se preparó una dilución 1:10.

**Preinóculo:** Se tomaron 2 mL del cultivo crecido 12 horas y se sembraron en 18 mL de Medio Schaeffer-Cm<sup>5</sup>. Se incubó 3 horas a 37°C y 250 rpm. Se midió y registró la DO.

**Inóculo-Curva:** Se tomaron 2 mL del Preinóculo y se sembraron en 18 mL de Medio Schaeffer-Cm<sup>5</sup>. Se incubó a 37°C y 250 rpm. Se midió y registró la DO a 600nm cada hora. Se graficó la DO vs Tiempo.

## 3.0 Preparación de alimento de camarón

Se crecieron las cepas de referencia *B. subtilis* BB80 y la cepa recombinante de *B. subtilis* BB80-19 en 500 mL cada una durante 3.5 horas hasta la fase exponencial tardía. Los 500 mL de cultivo se concentraron a 50 mL (10X), centrifugando 10 minutos a 5,000 rpm y 4°C. Los 50 mL de cultivo concentrado se adicionaron por aspersión a 100 grs. de alimento para camarón, se cubrió con aluminio y se dejó secar a temperatura ambiente (20°C) por dos días. Una vez seco el alimento se almacenó a 4°C. El tratamiento preparado con la cepa BB80 se denominó TT-BB80 y el preparado con la clona BB80-19 se denominó TT-BB80-19. Los tratamientos de control negativo y control positivo fue alimento comercial.

### **3.1 Bioensayo de infección con WSSV**

#### **3.1.1 Activación del WSSV**

La activación del virus se llevó a cabo con el objetivo de contar con la cantidad de tejido infectado suficiente y viable para el bioensayo. El tejido infectado fue proporcionado por la Dra. Ivone Giffard, UABC. La activación del virus se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

**F1:** Se infectaron 10 organismos, de 5 gramos de peso aproximadamente, con 5 gramos de tejido infectado (Pool de branquias, músculo y pleópodos). Se monitorearon durante los siguientes 10 días y se recolectaron los camarones moribundos que presentaron signos clínicos de la enfermedad. Para la recolección se envolvieron los organismos en aluminio y se colocaron en hielo seco para una congelación rápida. Posteriormente, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -70°C para su posterior uso en F2.

**F2:** Se infectaron 10 organismos, de 10-12 gramos de peso, con 10 gramos de tejido infectado F1 (Pool de branquias, músculo y pleópodos de organismos moribundos de F1); y 10 organismos, de 5 gramos de peso aproximadamente, con 5 gramos de tejido infectado F1. Se monitorearon durante los siguientes 10 días y se recolectaron los camarones moribundos que presentaron signos clínicos de la enfermedad. Para la recolección se envolvieron los organismos en aluminio y se colocaron en hielo seco para una congelación rápida. Posteriormente, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -70°C para su posterior uso en el Bioensayo.

Los organismos recolectados de F2 se utilizaron como tejido infectado para el bioensayo.

#### **3.1.2 Animales experimentales**

Se recibieron postlarvas 15 (PL15) de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, donadas por Acuicultura Mahr, La Paz, Baja California Sur. Las postlarvas se mantuvieron en estanques de 2500 L bajo recirculación constante de agua de mar del sistema cerrado, a 28°C, con aeración a saturación de O<sub>2</sub> y con alimento comercial. Posteriormente, se montó el sistema de bioensayo, para lo que se seleccionaron 5 animales de aproximadamente 2 g y se colocaron en estanques de 180 L (sistema semi-intensivo), se mantuvieron a 28°C, con aeración a saturación de O<sub>2</sub> y con un recambio de agua de mar del sistema cerrado cada 3 días.

### 3.1.3 Bioensayo

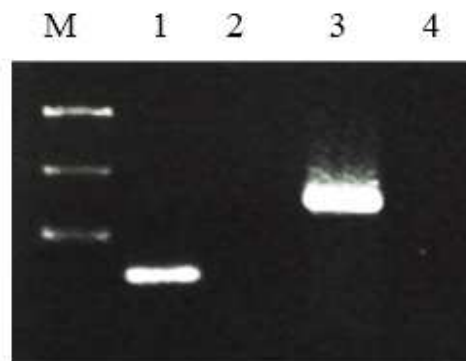
Una semana anterior a la infección con el WSSV cuando los organismos pesaban alrededor de 10-12 grs, los organismos del experimento se alimentaron de la siguiente manera; los organismos de los tratamientos control negativo y control positivo se siguieron alimentando con alimento comercial, a los organismos del tratamiento TT-BB80 se les proporciono el alimento que contiene la cepa de referencia *B. subtilis* BB80, a los organismos del tratamiento TTBB80-19 se les proporciono el alimento que contiene la cepa *B. subtilis* BB80-19 que tiene integrada la fusión *sacB::vp28*. Posteriormente, se infectaron animales de 10-12 gramos con 1 gramo de tejido infectado por organismo. Durante los siguientes días se monitorearon y registró en bitácora los organismos vivos. El Control negativo fueron organismos alimentados con alimento comercial que no se infectaron. El Control positivo fueron organismos alimentados con alimento comercial que se infectaron como se indica. Una semana post infección se realizó una segunda infección con 1.5 gramos de tejido infectado por organismo, se monitorearon y registraron en bitácora los organismos vivos. Durante todo el experimento se recolectaron los animales muertos para evitar canibalismo.

### Capítulo 3. Resultados

---

#### 3.1 Amplificación de fragmento sacB y vp28 por PCR

Se logró la amplificación del fragmento sacB de 300 pb a partir de ADN cromosomal de *Bacillus subtilis* y de vp28 de 615 pb a partir de ADN viral de WSSV (Figura 5).

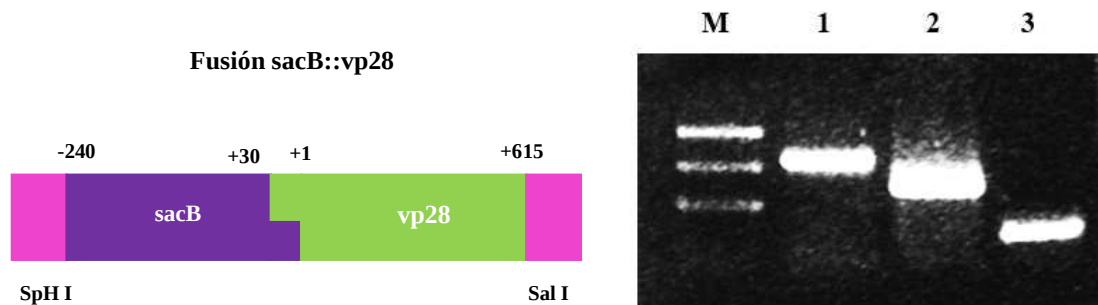


**Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR amplificados. M, Marcador de Peso Molecular de 450, 700 y 1100 pb, 1) sacB de 300 pb, 2) Control Negativo de sacB, 3) vp28 de 615 pb, 4) Control Negativo de vp28.**

#### 3.2 PCR sobrelapante

En la Figura 6a se muestra la representación esquemática de la fusión de sacB con vp28, donde, el extremo 3' del fragmento sacB hibrida con el extremo 5' del fragmento vp28. El producto de esta fusión (sacB::vp28) se denominó F y está representado por un fragmento de 915 pb, flanqueado en el extremo 5' por el sitio de corte para SpH I y en el extremo 3' por el sitio de corte para Sal I.

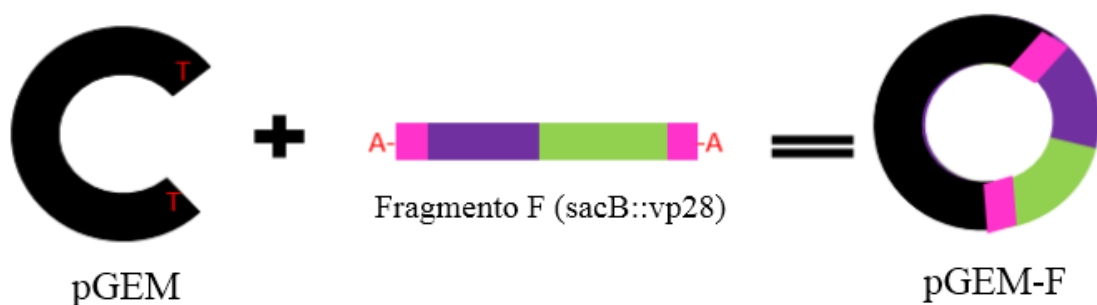
En la Figura 6b se presenta la electroforesis del producto del PCR sobrelapante (F) y los productos sin fusionar, vp28 y sacB.



**Figura 6. Fusión sacB::vp28 (F).** a) Representación esquemática de la fusión sacB::vp28 (F), b) Electroforesis. Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, 1) F de 915 pb, 2) vp28 de 615 pb y 3) sacB de 300 pb.

### 3.3 Construcción de pGEM-F

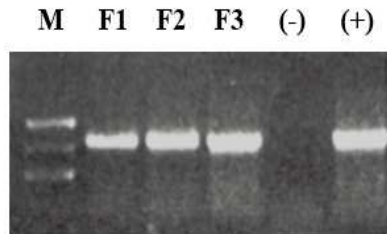
Se clonó el inserto F en el vector pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, Co.) para obtener el plásmido pGEM-F (Figura 7). El vector pGEM<sup>®</sup>-T linealizado cuenta con extremos 3' terminales de una sola T (en rojo) que son complementarias a las terminaciones A (en rojo) que agrega la *Taq pol* a los productos de PCR. Debido a esta complementariedad y por medio de la Ligasa añadida en la reacción, se logró clonar el inserto F en pGEM para obtener el plásmido pGEM-F. El plásmido pGEM-F cuenta por lo tanto con los sitios de corte para SpH I y Sal I (en color rosa) propios del fragmento F.



**Figura 7. Representación esquemática de pGEM-F.**

Producto de la transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$  con pGEM-F, se analizaron 3 colonias blancas al azar, identificadas como F1, F2 y F3, que lograron crecer en la placa de Agar LB Miller-

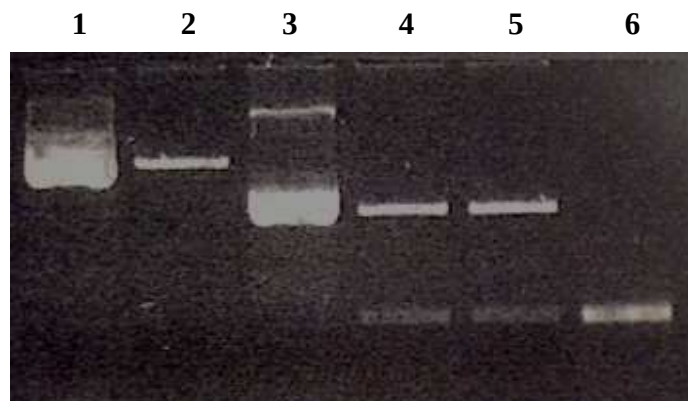
Amp<sup>50</sup>-Xgal-IPTG. Se realizó la PCR con 2 µL de ADN plasmídico de éstas y los oligos FS y RVP28. En la Figura 8 se presenta la electroforesis de los productos de PCR.



**Figura 8. Electroforesis de productos de PCR del fragmento F. Productos de PCR a partir de ADN plasmídico de las colonias F1, F2 y F3. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (-) Control negativo y (+) Control positivo.**

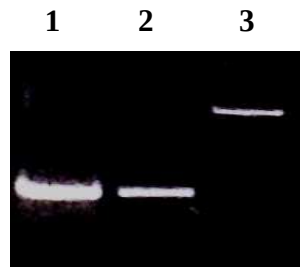
### 3.4 Construcción de pDGF

Una vez construido y purificado pGEM-F se prosiguió con la construcción de pDGF a partir de pGEM-F y pDG1662. La digestión de pGEM-F y pDG1662 se realizó de acuerdo a la reacción de digestión detallada en la Metodología. En la digestión de pGEM-F la escisión con las enzimas de restricción SpH I y Sal I dio como resultado un fragmento de ~3000 pb, que representa a pGEM linealizado y uno de ~900 pb, que representa al fragmento F liberado, dejando un extremo cohesivo para SpH I y otro extremo cohesivo para Sal I. Mientras que la digestión de pDG1662 dio como resultado la linealización del plásmido con la escisión de 85 pb, dejando igualmente un extremo cohesivo para SpH I y otro extremo cohesivo para Sal I.



**Figura 9. Electroforesis de la digestión de pGEM-F y pDG1662 con las enzimas de restricción SpH I y Sal I. 1) pDG1662 sin digerir, 2) pDG1662 digerido, 3) pGEM-F sin digerir, 4) y 5) pGEM-F digerido, 6) Producto de PCR de 915 pb.**

Las purificaciones del fragmento F liberado (inserto) y pDG1662 digerido (vector) (Figura 10) se utilizaron en la reacción de ligación para obtener el plásmido pDGF.

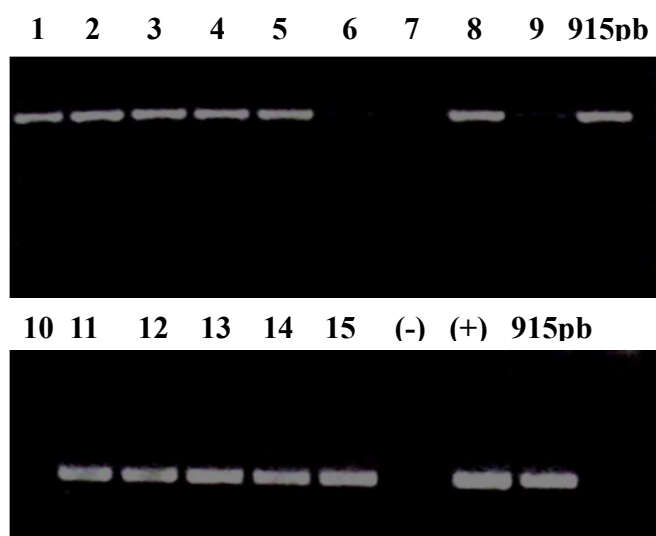


**Figura 10.** Electroforesis de productos de digestión purificados. Los productos de digestión se purificaron con kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, USA). 1) Producto de PCR de 915 pb, 2) Fragmento F digerido y purificado, 3) pDG1662 digerido y purificado.



**Figura 11.** Representación esquemática del plásmido pDGF. El plásmido pDGF es el resultado de la inserción de la fusión *sacB::vp28* en pDG1662.

El pDGF obtenido se transformó en *E. coli DH5α*, se analizaron por PCR 15 colonias que lograron crecer en la placa de Agar LB Miller-Amp<sup>50</sup>. La PCR se realizó con 2 µL de ADN plasmídico de éstas y los oligos FS y RVP28. En la Figura 12 se presenta la electroforesis de los productos de PCR.

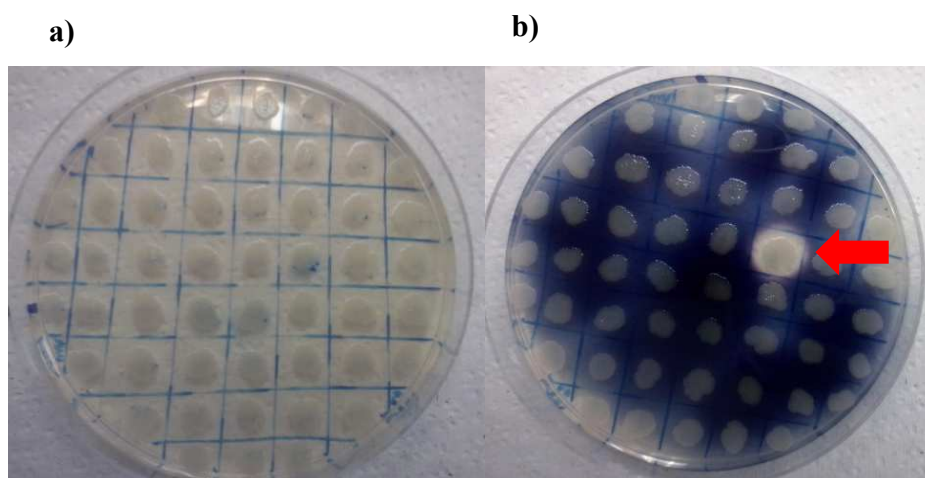


**Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR. Fragmento F a partir de ADN plasmídico de las colonias 1-15. (-) Control negativo, (+) Control positivo, Producto de PCR de 915 pb.**

### **3.5 Transformación de *Bacillus subtilis***

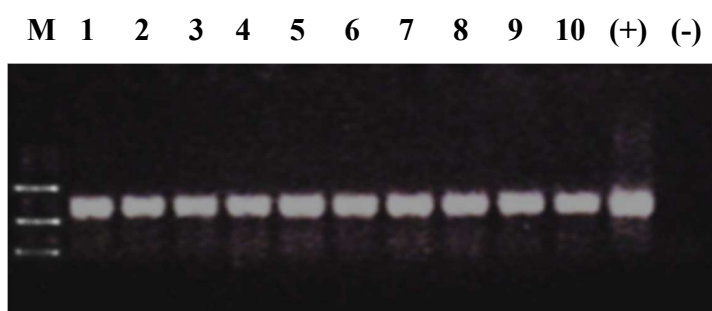
Una vez construido y purificado pDGF se prosiguió con la transformación de *Bacillus subtilis* BB80.

Producto de la transformación 1 (10  $\mu$ L de ADN plasmídico pDGF como ADN exógeno) se obtuvieron 115 colonias capaces de crecer en presencia de Cm<sup>5</sup>. Dichas colonias fueron resembradas en Agar LB-almidón-Cm<sup>5</sup> para evaluar actividad de  $\alpha$ -amilasa extracelular de la cepa de *Bacillus subtilis* transformada (BB80-18). Ninguna de las colonias sembradas en Agar LB-almidón-Cm<sup>5</sup> presentó halo de degradación del almidón. El almidón del medio al reaccionar con yodo genera un patrón de coloración oscuro, cuando el almidón se degrada por la amilasa se observa un halo transparente (Figura 13).



**Figura 13. Tinción de Yodo de las clonas de *Bacillus* transformada con pDGF. a) Cultivo de *Bacillus subtilis* transformada con pDGF sin teñir, b) Tinción del Yodo sobre el almidón, se observa una colonia que presenta un halo de degradación de almidón (marcada por la flecha roja).**

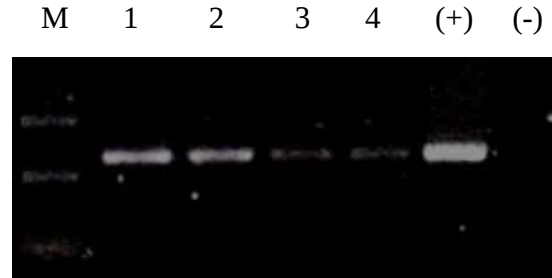
Tras la transformación de *Bacillus subtilis* BB80 *his gly trp* con pDGF, se analizaron por PCR 10 colonias que lograron crecer en la placa de Agar LB-Cm<sup>5</sup> y no presentaron halo de degradación del almidón. La PCR se realizó con 2  $\mu$ L de ADN cromosomal de éstas y los oligos FS y RVP28 para comprobar la presencia de la fusión en las cepas. En la Figura 14 se presenta la electroforesis de los productos de PCR.



**Figura 14. Electroforesis de los productos de PCR del Fragmento F a partir de ADN cromosomal de las colonias 1-10. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (+) Control Positivo, (-) Control Negativo.**

Las clonas que por medio de PCR muestran amplificación del fragmento F se nombraron cepa *Bacillus subtilis* BB80-19.

Producto de la transformación 2 (Co-transformación con 10  $\mu$ L de ADN plasmídico pDGF y 10  $\mu$ L de ADN cromosomal de la cepa *B. subtilis* BB80-17 como ADN exógeno) se obtuvieron 254 colonias capaces de crecer en presencia de Cm<sup>5</sup>. Dichas colonias fueron resembradas en Agar LB-almidón-Cm<sup>5</sup> para evaluar actividad de  $\alpha$ -amilasa extracelular de la cepa de *B. subtilis* transformada. De las 254 colonias sólo las colonias 17, 74 y 155 presentaron halo de degradación del almidón. Las 254 colonias fueron sembradas a la par en Medio Mínimo-Gli-Trp para la determinación de auxotrofías. De las 254 sólo lograron crecer las colonias 93, 109, 195 y 233, que corresponden a las colonias capaces de desarrollarse en ausencia de Histidina en el medio. Cuando se recombina la mutación *degU* acarrea el gen sano de Histidina. Por lo que, si la cepa a transformar inicialmente no tiene la capacidad de sintetizar Histidina, hay que agregarla al medio, pero al ser transformada con la mutación *degU*, esta tendrá la capacidad de sintetizarla (Olmos y Contreras, 2003). Se analizaron por PCR las 4 colonias que crecieron en Medio Mínimo-Gli-Trp y no presentaron halo de degradación del almidón. La PCR se realizó con 2  $\mu$ L de ADN cromosomal de éstas y los oligos FS y RVP28. En la Figura 15 se presenta la electroforesis de los productos de PCR.

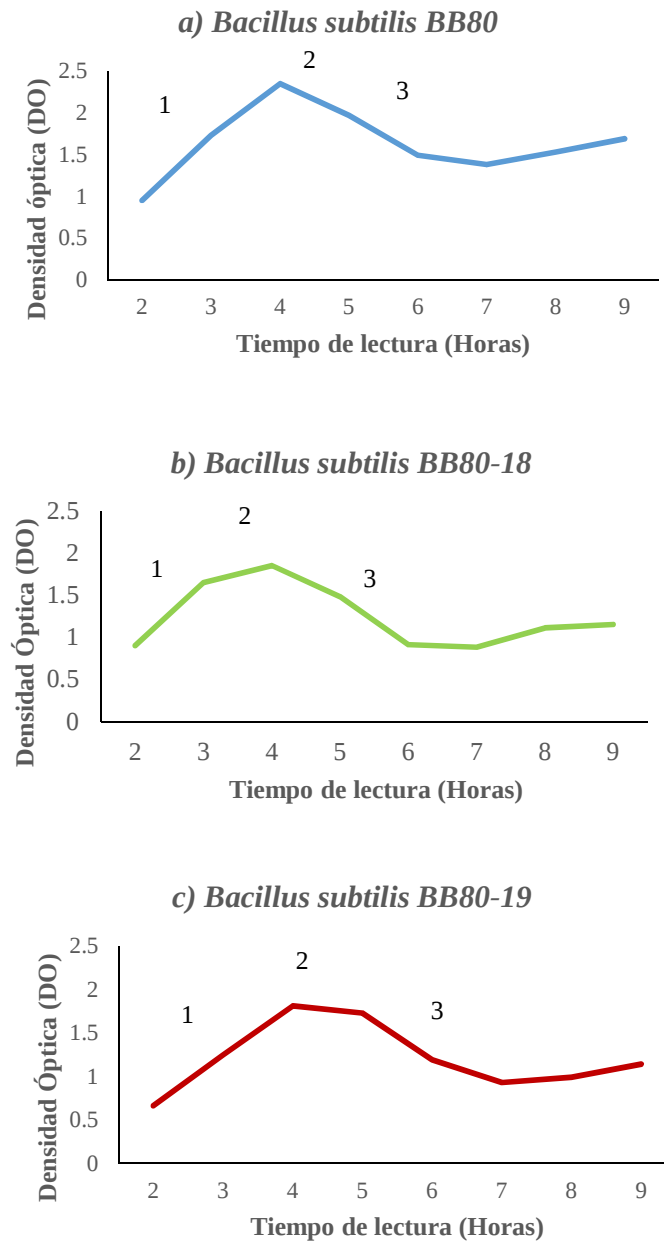


**Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR del Fragmento F a partir de ADN cromosomal de las 4 colonias que crecieron en Medio Mínimo- Gli-Trp. M, Marcador de peso molecular de 450, 700 y 1100 pb, (+) Control Positivo, (-) Control Negativo.**

Las 4 colonias que por medio de PCR muestran amplificación del fragmento F se nombraron cepa *Bacillus subtilis* BB80-19.

### 3.6 Curvas de Crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis*

Se realizó las curvas de crecimiento para las cepas BB80, BB80-18 y BB80-19. Se registró la densidad óptica y se graficó vs el tiempo de lectura en horas. En la Figura 16 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas de *Bacillus*.



**Figura 16. Curvas de crecimiento de *Bacillus subtilis*. a) Cepa de referencia BB80, b) Cepa BB80-18, c) Cepa BB80-19. Se observan la fase exponencial (1) que se presenta de las 2-4 horas de lectura, la fase estacionaria (2) alrededor de las 4 horas, y finalmente la fase de muerte celular (3) con el decaimiento de la lectura de DO.**

### 3.7 Alimento de camarón recubierto con la vacuna

El alimento preparado con el cultivo de *B. subtilis BB80* se denominó TT-BB80 y TT-BB80-19 para el preparado con el cultivo de *B. subtilis BB80-19*.

### 3.8 Bioensayo

En la Tabla 10 se muestra el registro de organismos vivos tras la infección con el WSSV. Todos los tratamientos fueron proporcionados una semana anterior a la infección.

Tabla 10. Registro de organismos vivos tras la infección con el WSSV.

| Tratamiento      | Número inicial de organismos | Número de organismos vivos |   |   |   |   |   |   |     |   |    |    |    |
|------------------|------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---|-----|---|----|----|----|
|                  |                              | DIAS POST INFECCIÓN        |   |   |   |   |   |   |     |   |    |    |    |
|                  |                              | 1                          | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 * | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Control Negativo | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5   | 5 | 5  | 5  | 5  |
| Control Negativo | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5   | 5 | 5  | 5  | 5  |
| Control Positivo | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1   | 1 | 0  | 0  | 0  |
| Control Positivo | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 2 | 2   | 1 | 0  | 0  | 0  |
| TT-BB80          | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 2   | 2 | 1  | 0  | 0  |
| TT-BB80          | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 3 | 3   | 3 | 2  | 1  | 0  |
| TT-BB80-19       | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5   | 5 | 3  | 3  | 3  |
| TT-BB80-19       | 5                            | 5                          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5   | 5 | 5  | 5  | 5  |

El tratamiento TT-BB80 es el alimento preparado con la cepa *B. subtilis BB80* y el TT-BB80-19 es el preparado con la cepa *B. subtilis BB80-19*. \* El día 8 post infección se realizó una segunda infección proporcionando 1.5 gramos de tejido infectado por organismo.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Discusiones

La integración de la fusión *sacB::vp28* (F) y la mutación *degU32* al genoma de *B. subtilis* generó la cepa *B. subtilis* BB80-19 y permitirá la expresión constante de ARN de VP28. La integración de genes heterólogos en sitios específicos del cromosoma de *B. subtilis* ha sido empleado para mejorar la estabilidad de la expresión génica (Ferreira *et al.*, 2005).

De acuerdo a los resultados de las curvas de crecimiento realizadas a las cepas de *Bacillus subtilis* BB80, BB80-18 y BB80-19, éstas presentaron el mismo patrón de crecimiento, donde, la fase de crecimiento exponencial se presentó entre las 2-4 horas, la fase estacionaria alrededor de las 4-5 horas, y la fase de muerte celular con el declive del gráfico, se presentó de las 5-8 horas de tiempo de lectura, indicando que el crecimiento de las cepas no se ve afectado por las modificaciones realizadas.

Dentro de los signos clínicos que mostraron los organismos posterior a la infección incluye la disminución del consumo de alimento, el nado errático (se observaban desorientados o con dificultad para llegar a la superficie), enrojecimiento de los animales (por los cromatóforos expandidos), letargia (movimiento lento o se observaban en el fondo del estanque) y en algunos organismos se observaban manchas blancas en el exoesqueleto. Características que concuerdan con los signos clínicos reportados para la infección del WSSV (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

L. Fu y colaboradores compararon el uso de esporas y células vegetativas de *Bacillus subtilis* que expresaban proteína VP28, reportando tasas mayores al 50% de sobrevivencia en camarones desafiados 3, 14 y 28 días postvacunación con pellets recubiertos con las células vegetativas y esporas. Estos resultados dan una pauta para de la administración oral de *Bacillus subtilis* como vehículo de presentación de antígenos y su posible uso para la prevención de WSSV en camarón (Fu *et al.*, 2008).

Los organismos vacunados con la cepa *B. subtilis* BB80-19 sobrevivieron a la infección con WSSV por un periodo de tiempo más prolongado. Estudios recientes han mostrado que es posible el bloqueo de la progresión de la enfermedad viral por inyección con dsRNA (ARN de doble cadena) de genes virales específicos. Esta estrategia es efectiva en al menos tres virus: WSSV, TSV

(Taura Syndrome Virus) y YHV (Yellow Head Virus) (Robalino *et al.*, 2007). Se han diseñado ARN de interferencia cortos (siARNs) de 21-25 pb de longitud, para el control del WSSV, los cuales han sido pobres inductores de la inmunidad antiviral secuencia específica, pero al aumentar la longitud del ARN la protección aumenta y el tiempo de protección se prolonga. Por ejemplo, el dsARN de longitud completa del gen de *vp19* provee un alto nivel de protección mientras que pequeños ARNi del mismo gen no protegieron (Robalino *et al.*, 2005). La cepa de *B. subtilis* BB80-19 contiene la longitud completa del gen *vp28* (615 pb) ya que contiene la información para expresar ARN de la proteína VP28, bajo la regulación del promotor fuerte y de expresión constitutiva de *sacB*, en conjunto con la mutación *degU32* que induce la sobreexpresión del promotor de *sacB* lo cual predice un potencial aumento de la expresión del ARN de VP28, el cual funciona como ARNi y le confiere a los organismos vacunados con esta cepa una respuesta antiviral ante la infección con WSSV. Se ha observado que dsARN de secuencia no específica provee protección a corto plazo. Lo que lleva a especular que el dsARN induce dos vías: la respuesta inespecífica y la de ARN de interferencia (Robalino *et al.*, 2007). Los factores desencadenantes de ARNi inespecíficos si mejoran la respuesta antiviral del camarón pero no confieren una respuesta específica contra el virus (Bartholomay *et al.*, 2012).

Otros estudios han mostrado que la inyección intramuscular de dsRNA, ssRNA (ARN de cadena sencilla) y constructos de ADN para expresar dsARN protegen contra la infección del WSSV, resultando en altas tasas de sobrevivencia (Robalino *et al.*, 2005; Robalino *et al.*, 2007; Sarathi *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009; Sarathi *et al.*, 2010; Paria *et al.*, 2013). A pesar de los resultados exitosos la desventaja de estos estudios es la necesidad de la inyección intramuscular del ARN que provea al organismo protección contra la infección. Debido a la cantidad de organismos que se manipulan en el cultivo de camarón esta metodología es impráctica. El uso de la cepa de *B. subtilis* BB80-19 permite una administración oral por medio de la alimentación. Adicionalmente, a pesar de la eficiencia de los constructos de ADN, estos utilizan el promotor de Citomegalovirus (CMV), promotor que regula la transcripción de un virus en células eucariotas y por motivos de seguridad estas vacunas no podrían ser comercializadas (Krishnan *et al.*, 2009; Bartholomay *et al.*, 2012; Paria *et al.*, 2013). La expresión de ARN bajo la regulación del promotor de *sacB* de la cepa *B. subtilis* BB80-19 no representa ningún riesgo ya que *Bacillus subtilis* tiene actividad probiótica y se ha recomendado su uso como suplemento en el alimento de camarón y

como control de bacterias patógenas en el ambiente de cultivo (Farzarfan, A., 2006; Nimawe & Selvin, 2009; Olmos *et al.*, 2011).

La sobrevivencia a varios desafíos con WSSV posteriores a la vacunación con la cepa *BB80-19* concuerda con las altas tasas reportadas anteriormente (Robalino *et al.*, 2005; Mejía Ruiz *et al.*, 2011).

El mecanismo de ARNi es un proceso que emplea rutas de procesamiento de pequeños ARNs para reconocer, unirse y degradar dsARN en pequeños ARNs que previenen la expresión del gen de interés de manera secuencia-específica (Bartholomay *et al.*, 2012). Los mecanismos de acción del ARNi en camarón *Litopenaeus vannamei* aún son desconocidos. En base a un sencillo experimento, Robalino y colaboradores marcaron la pauta para establecer la teoría sobre la maquinaria del ARNi en camarón. La inyección de dsRNA de hemocianina en el camarón resultó en la disminución del ARNm de hemocianina, los resultados de este experimento sugieren que el dsRNA viaja, probablemente por la circulación, del sitio de inyección a tejidos distantes. El dsARN extracelular es ingresado al interior de las células del camarón y finalmente interfiere con la traducción de la proteína de interés, por lo que propone la existencia de maquinaria de ARNi en camarón (Robalino *et al.*, 2007). SID-1, es una proteína transmembranal que sirve como canal para el transporte de dsARN. Lv-SID-1, homóloga a SID-1 presente en *Litopenaeus vannamei*, es funcional durante el evento de ARNi y fue caracterizada como una proteína indispensable para la respuesta antiviral específica e inespecífica (Labreuche *et al.*, 2010). Sin embargo, moléculas sintéticas que mimetizan a moléculas naturales de dsARN y ssARN también pueden ser transportadas e internalizadas por SID-1 (Shih y Hunter, 2011), lo que podría explicar porque el tratamiento con la cepa *BB80-19*, que expresa ARN de VP28 de manera potencialmente aumentada, provee una protección contra la infección de WSSV.

Las ventajas del uso de *Bacillus subtilis*, frente a los métodos anteriormente utilizados como métodos de control de WSSV en camarón, resalta el que no es un organismo patógeno, por lo que no hay que someterlo a un proceso extra de modificación para atenuar genes de patogenicidad, permitiendo la administración oral como un proceso viable en acuicultura. Tiene actividad probiótica la cual podría funcionar como adyuvante. Tiene capacidad de crecer en medios simples y económicos, lo que disminuye el costo de producción. Ventajas que cubren la necesidad del desarrollo de vacunas basadas en ácidos nucleicos para su aplicación práctica y rentable en el cultivo de camarón (Bartholomay *et al.*, 2012).

## Conclusiones

Se logró amplificar, fusionar en fase y establecer la expresión de ARN de vp28, del virus de la mancha blanca, bajo la regulación del promotor de *sacB* de *Bacillus subtilis*.

Las cepas, producto de la transformación 1, que por medio de PCR muestran amplificación del fragmento F, indican que se logró integrar satisfactoriamente el fragmento F en el genoma de *Bacillus subtilis* BB80, por lo que se le ha nombrado a esta cepa, *Bacillus subtilis* BB80-18.

Las cepas, producto de la transformación 2, que crecieron en Medio Mínimo-Gli-Trp y por medio de PCR muestran amplificación del fragmento F, indican que se logró co-transformar e integrar satisfactoriamente el fragmento F y la mutación *degU32* en el genoma de *Bacillus subtilis* BB80, por lo que se le ha nombrado a esta cepa, *Bacillus subtilis* BB80-19.

De acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas, la integración del fragmento F, que codifica para la expresión de ARN de VP28 del virus de la mancha blanca, bajo la regulación del promotor de *sacB*, no afecta la curva de crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* transformadas. Así como tampoco se ve afectada por la integración de la mutación *degU32*.

El presente estudio muestra que la administración oral de pellets recubiertos con *Bacillus subtilis* BB80-19, productora de ARN de VP28, provee una protección contra la infección experimental de WSSV en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Son necesarios más estudios para determinar el mecanismo acción del ARNi que confiere la respuesta antiviral en el camarón.

## Perspectivas

- Determinar cuantitativamente la expresión de ARNi en la cepa *Bacillus subtilis* BB80-19 por PCR tiempo real.
- Evaluar la capacidad protectora del ARNi producido por la cepa *Bacillus subtilis* BB80-19 a mayores días de cultivo y múltiples desafíos con WSSV.
- Evaluar la capacidad protectora del ARNi producido por la cepa *Bacillus subtilis* BB80-19 en diferentes estadios del camarón.
- Determinar el mecanismo de acción del ARNi producido por la cepa *Bacillus subtilis* BB80-19 en el camarón.
- Determinar los efectos del ARNi en los mecanismos de la inmunidad innata en camarón.
- Sustituir el gen de *vp28* por los genes de otras proteínas virales para evaluar la capacidad protectora del ARNi producido y universalizar el modelo de expresión de proteínas virales para el WSSV.

## Referencias bibliográficas

---

- Arellano, C y Olmos, J. (2002). A thermostable 1,4 and 1,6-glucosidase is over produced by strain of *Bacillus sp* isolated from marine environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18. 791-795.
- Aymerich, S., Gonzy, G. & Steinmetz, M. (1986). 5'-nncoding region *sacR* is the target of all regulation affecting the levansucrase gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166(3).993-998.
- Bartholomay, L. C., Loy, D. S., Dustin Loy, J., & Harris, D. L. (2012). Nucleic-acid based antivirals: augmenting RNA interference to "vaccinate"*Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2). 261–266.
- Brown, A., Crisanti, A. & Catteruccia, F. (2003). Comparative analysis of DNA vectors at mediating RNAi in *Anopheles* mosquito cells and larvae. *J Exp Biol*. 206. 1817-1823.
- Brummelkamp, T., Bernanrds, R. & Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296. 550-553.
- Denli, A. & Hannon, G. (2003). RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci*. 28. 196-201.
- Durand, S., Lightner, D., Nunan, L., Redman, R., Mari, J. & Bonami, J. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*. 27. 59-66.
- Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411.494-498.
- Escobedo, C., Alday, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M. & Nauwynck, H. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis, and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*. 31. 1-18.
- FAO. (2010). Revisión regional sobre la situación y tendencias en el desarrollo de la acuicultura en América Latina y el Caribe. Circular de Pesca y Acuicultura No 1061/3.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med Microbiol*. 48(2). 149-158.
- Ferreira, L., Ferreira, R. y Schumann, W. (2005). *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vector. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 77 (1). 113-124.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.391. 806-811.

- Fu, L. L., Li, W. F., Du, H. H., Dai, W., & Xu, Z. R. (2008). Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. *Letters in Applied Microbiology*. 46(5). 581–586.
- Harwood, C. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* 10. 247-256.
- Harwood, C. & Moszer, I. (2002). From gene regulation to gene function: regulatory networks in *Bacillus subtilis*. *Comp Funct Genom.* 3. 37-41.
- Hecker, M., & Volker, U. (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma^B$  regulon. *Mol Microbiol.* 29. 1129-1136.
- Jager, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G. & Wohlleben W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology.* 174 (6). 5462-5465.
- Jiménez, N., Coll, J., Estepa, A. y Tafalla, C. (2005). Futuro de las vacunas ADN frente a virus en Acuicultura. *AquaTic.* 23. 20–35.
- Kim, C., Kosuke, Z., Nam, Y., Kim, S. & Kim, K. (2007). Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology.* 23. 242-246.
- Klier, A., Fouet, A., Debarbouille, M., Kunst, F. & Rapoport, G. (1987). Distinct control sites located upstream from the levansucrase gene of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology.* 1(2). 233-242
- Krishnan, P., Gireesh P., Saravanan, S., Rajendran, K. & Chaudhari, A. (2009). DNA constructs expressing long-harpin RNA (lhRNA) protect *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus. *Vaccine.* 27. 3849-3855.
- Kunst, F., Ogasawara, I., & Moszer. (1997). The complete genome sequence of the gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390. 249-256.
- Labreuche Y, Veloso A, de la Vega E, Gross PS, Chapman RW, Browdy CL & Warr GW. (2010). Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and comparative Immunology.* 34 (11). 1209-1218.
- Lightner, D. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society. Section 3, page 3. Recuperado de: <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/CAMARONPATOLOGIA.pdf>

- Lin, S., Chang, Y., Wang, H., Tzeng, H., Chang, Z., Lin, J., *et al.* Ribonucleotide reductase of shrimp white spot syndrome virus (WSSV): expression and enzymatic activity in a baculovirus/insect cell system and WSSV-infected shrimp. *Virology*. 289. 362-377.
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H., Broitman-Maduro, Li, W. & Ding, S. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 436. 1040-1043.
- Molina, Z., Galaviz, L., Alcocer, J. & Rosales, J. (2007). Filogenia de las proteínas estructurales del virus de la mancha blanca (WSSV) patógeno de *Litopenaeus spp.* *Ciencia UANL*. 3. 275-281.
- Mountain, A. (1989). Gene expression systems for *Bacillus subtilis*. Volumen 2. Ed. Harwood, C. R. Plenum Press, New York.
- Mudagandur, S. & Yuanan, Lu. (2009). Review Application of nucleic-acid-based therapeutics for viral infections in shrimp aquaculture. *Mar Biotechnol*. 11. 1-9.
- Ninawe, A. & Selvin, J. (2009). Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Crit Rev Microbiol*. 35(1). 43-66.
- Ochoa, S. y Olmos, J. (2006). Functional property of *Bacillus subtilis* from feed. *Food Microbiology*. 23 (9). 519-525.
- Olmos, J., Bolaños, V., Causey, S., Ferrari, E., Bolivar, F. y Valle, F. (1996). A functional SpoOA is required for maximal aprE expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*. 381. 29-31.
- Olmos, J., Deanda, R., Ferrari, E., Bolivar, F. y Valle, F. (1997). Effects of sinR and *degU32(Hy)* mutations on the regulation of the aprE gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular General Genetics*. 253. 562-567.
- Olmos, J. y Contreras, R. (2003). Genetics constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62. 369-373.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua, J. y Contreras, R. (2011). Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fishmeal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotics strains. *Marine Drugs*. 9. 1119-1132
- Paria, A., Greeshma, S., Chaudhari, A., Makesh, M., Purushothaman, C. & Rajendran, K. (2013). Nonspecific effect of double-stranded (ds) RNA on prophenoloxidase (proPO) expression in *Penaeus monodon*. *Appl Biochem Biotechnol*. 169(1). 281-289.
- Pellicic, V., Reyrat, J. & Gicquel B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *Journal of Bacteriology*. 178 (4). 1197-1199.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R., Gross, P., Browdy, C. & Warr, G. (2005). Double-Stranded RNA induces sequence-specific antiviral

silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal of Virology*. 79 (21). 13561-13571.

Robalino, J., Bartlett, T., Chapman, R., Gross, P., Browdy, C., & Warr, G. (2007). Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 31(6). 539–547.

Sánchez, A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concert. *Vet. Res*. 41(6). 41-43.

Sánchez. G. y Olmos, J. (2004). *Bacillus subtilis* transcriptional regulators interaction. *Biotechnology Letters*. 26. 403-407.

Sarathi, M., Simon, M., Venkatesan, C., & Sahul, A. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar Biotechnol*. 10. 242-249.

Sarathi, M., Simon, M. C., Venkatesan, C., Thomas, J., Ravi, M., Madan, N., Sahul & Hameed, S. (2010). Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of white spot syndrome virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. *Journal of Fish Diseases*. 33(7), 603–607.

Shimotsu, H. & Henner, D. (1986). Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. *J. of Bacteriol*. 168(1). 380-388.

Tang, F. & Yin J. (2004). RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Res*. 14. 460-466.

Tang, X., Wu, J., Siravaman, J., & Hew, C. (2007). Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *Virol*. 81. 6709-6717.

Tsukahara, K. & Ogura, M. (2008). Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. *BMC Microbiology*. 8(1). doi:10.1186/1471-2180-8-8

Valdez Castillo, A. (2008). Diseño y construcción de una cepa de *Bacillus subtilis* genéticamente modificada para desplegar sobre su espora moléculas bioactivas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 76.

Van, H., Witteveldt, J., Peters, S., Kloostboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., *et al.* (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virol*. 285. 228-233.

Vlak, J., Bonami, J., Flegel, T., Kou, G., Lightner, D., Lo, C., Loh, C., & Walker P. (2005). *Nimaviridae*. VIIIth report of the international committee on taxonomy of vires. Elsevier. 187-192.

Xie X. & Yang, F. (2005). Interaction of White spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*. 336. 93-99.

Yang, F., He, J., Lin, Q., Pan, D., Zhang, X. & Xu, X. (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilli-form virus. *Journal of Virology*. 75. 11811-11820.

Yi G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J., & Hu, L. (2004). VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *Biochemistry and Molecular Biology*. 37. 726-734.

## Anexo

---

### 1. Protocolos

#### I. Extracción de ADN cromosomal

1. Crecimiento: Inocular 3 mL de medio LB con la cepa de interés. Crece 6-8 horas con las condiciones específicas para la cepa de interés (antibiótico, temperatura, etc.).
2. Tomar 1.5 mL de la suspensión bacteriana y centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm.
3. Decantar sobrenadante y resuspender el pellet con 567  $\mu$ L de Buffer TE (Tris-HCl 10mM, pH=8; EDTA 1mM, pH=8).
4. Agregar 5  $\mu$ L de Lizosima 10mg/mL e incubar 10 minutos a 37°C.
5. Agregar 10  $\mu$ L de RNAasa 10mg/mL e incubar 20 minutos a 37°C.
6. Adicionar 30  $\mu$ L de SDS 10% y 3  $\mu$ L de Proteinasa K 20mg/mL e incubar 1 hora a 37°C.  
Nota: La solución debe tornarse translúcida.
7. Adicionar 100  $\mu$ L de NaCl 5M y mezclar.
8. Agregar 80  $\mu$ L de Solución de CTAB/NaCl (CTAB al 10% en una solución de NaCl 0.7M).  
Mezclar e incubar 10 minutos a 65°C (tapas los tubos con parafilm y tapas de seguridad).
9. Agregar 700  $\mu$ L de solución Cloroformo/Alcohol Isoamílico 24:1, agitar y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
10. Transferir el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo nuevo. Si es muy gruesa la interfase repetir el paso 6.
11. Agregar un volumen igual de solución Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico 25:24:1, agitar y centrifugar 5 minutos a 14, 000 rpm.
12. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (aproximadamente 600  $\mu$ L).
13. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol (360  $\mu$ L) para precipitar los ácidos nucleicos. Agitar el tubo y centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm.
14. Decantar el sobrenadante.
15. Lavar con 1 mL de Etanol al 70%. Centrifugar 5 minutos a 14, 000 rpm y decantar el sobrenadante.
16. Secar el pellet a temperatura ambiente.

17. Resuspender el pellet con 100  $\mu$ L de Buffer TE.

## **II. Extracción de ADN plasmídico**

1. Crecimiento: Inocular 3 mL de medio LB Miller con la cepa *E. coli* de interés. Agregar Ampicilina para llevar a una concentración de 50  $\mu$ g/mL de medio. Crecer 6-8 horas a 37°C a 250 rpm.
2. Tomar 1.5 mL de la suspensión bacteriana y centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm.
3. Decantar sobrenadante y resuspender el pellet con 100  $\mu$ L de Solución 1 fría.
4. Agregar 150  $\mu$ L de la Solución 2 y mezclar por inversión suavemente.
5. Incubar 5 minutos en hielo.
6. Agregar 200  $\mu$ L de la Solución 3 y mezclar por inversión suavemente.
7. Incubar 10 minutos en hielo.
18. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm.
19. Tomar el sobrenadante, evitando tocar o tomar el precipitado blanco, y pasarlo a un tubo nuevo tomando nota del volumen extraído (aproximadamente 400  $\mu$ L).
20. Si aún se observan precipitados blancos, repetir el paso 9.
21. Tratar con 4  $\mu$ L de RNAasa 10mg/mL e incubar 15 minutos a 37°C.
22. Precipitar el ADN plasmídico con dos volúmenes de Etanol Absoluto (800  $\mu$ L). Invertir varias veces para mezclar y mantener 30 minutos a -20°C.
23. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm.
24. Decantar el sobrenadante y lavar el ADN plasmídico con 500  $\mu$ L de Etanol al 70%. Invertir varias veces.
25. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
26. Descartar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente por no más de 10 minutos.
27. Resuspender en 80  $\mu$ L de Buffer TE o H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.
28. Almacenar a -20°C.

### III. Preparación de células competentes *E. coli DH5α*

1. Crecer *E. coli DH5α* en 5 mL de LB Miller sin antibiótico durante toda la noche a 37°C y 200 rpm.
2. Diluir el cultivo 1:50 en LB Miller fresco sin antibiótico, crecer a 37°C y 200 rpm hasta una DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0.3-0.4.
3. Concentrar las células por centrifugación a 4°C, 5 minutos y 2,500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en ½ volumen de CaCl<sub>2</sub> 100mM frío. Incubar 20 minutos en hielo.
4. Concentrar las células por centrifugación a 4°C, 5 minutos y 2,500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en 1/10 volumen de CaCl<sub>2</sub> 100mM frío. Incubar 1 hora en hielo.
5. Usar inmediatamente por choque térmico (50 µL de células competentes por transformación) o agregar glicerol estéril a una concentración final de 15%, alicuotar 200 µL en tubos de 600 µL estériles y almacenar a -80°C.

### IV. Transformación de células competentes *E. coli DH5α*

1. Descongelar en hielo las células competentes *E. coli DH5α*.
2. En un tubo de 1.5 mL estéril, agregar 50 µL de células competentes *E. coli DH5α* y 1 µL ADN plasmídico o 5-8 µL de producto de ligación, según sea el caso. Homogenizar con la micropipeta.
3. Incubar 30 minutos en hielo.
4. Colocar 2 minutos en baño maría a 42°C (shock térmico) e inmediatamente colocar 2 minutos en hielo.
5. Agregar 900 µL de LB Miller sin antibiótico.
6. Incubar 1 hora a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, centrifugar los tubos por 1 minuto a 14,000 rpm.
7. Descartar 800 µL del sobrenadante y con el medio restante, 100-150 µL, resuspender el pellet agitando los tubos suavemente.
8. Plaquear (con 6 perlitas estériles) en cajas de LB Miller-Amp<sup>50</sup>-Xgal-IPTG, para el caso de pGEM-F; y en cajas de LB Miller-Amp<sup>50</sup>, para el caso de transformación con pDGF.
9. Incubar las placas a 37°C de 12-24 horas.

10. Al siguiente día se observaran colonias que lograron crecer en presencia de ampicilina. Las colonias se resembraran en otro placa de LB Miller-Amp<sup>50</sup> para su almacenamiento y uso posterior a 4°C.

**V. Transformación de *Bacillus subtilis*.**

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

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Sales de Bacillus 10X       | 250.0 µL  |
| Glucosa al 20%              | 62.5 µL   |
| MgSO <sub>4</sub> 1M        | 12.5 µL   |
| Casaminoácidos al 20%       | 2.5 µL    |
| Triptófano 10mg/mL          | 31.2 µL   |
| Histidina 10mg/mL           | 31.2 µL   |
| Glicina 10mg/mL             | 31.2 µL   |
| H <sub>2</sub> O dd estéril | 2079.0 µL |

Mezclar todos los ingredientes en un tubo de ensaye de 18 X 150 estéril con tapa para permitir la oxigenación.

3. Agitar a 300 rpm y 37°C durante 5 horas o hasta que se obtenga un movimiento flagelar fuerte. Lo anterior debe irse verificando en el microscopio.
4. Preparar un segundo medio de dilución que contenga los siguientes nutrientes:

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Sales de Bacillus 10X       | 250.0 µL  |
| Glucosa al 20%              | 62.5 µL   |
| MgSO <sub>4</sub> 1M        | 12.5 µL   |
| Casaminoácidos al 20%       | 1.25 µL   |
| Triptófano 10mg/mL          | 3.1 µL    |
| Histidina 10mg/mL           | 3.1 µL    |
| Glicina 10mg/mL             | 3.1 µL    |
| H <sub>2</sub> O dd estéril | 2165.0 µL |

5. Preparar una dilución 1:10 del cultivo crecido 5 horas con el segundo medio de dilución (250 µL cultivo crecido 5 horas + 2.25 mL de medio de dilución). Adicionar a dos tubos de

ensaye 1 mL de la dilución, y sólo a un tubo (problema) adicionar 10 µL de ADN con el cual se desea transformar a *Bacillus subtilis* y otro tubo (control) no se le adiciona nada.

6. Colocar los tubos de nuevo en el agitador a 37°C e incubar 1.5 horas.
7. Preparar las cajas con antibiótico o cajas selectivas de auxotrofia que se transfirió con el ADN con el cual se transformó. Plaquear 100 µL del cultivo transformado e incubar a 37°C por 24 horas.

## **VI. Purificación de productos de PCR**

1. Mezclar 100 µL de producto de PCR, previamente visualizado en gel de agarosa para confirmar que sea el producto específico, con 400 µL de H<sub>2</sub>O y homogenizar.
2. Agregar 250 µL de Fenol y dar vortex.
3. Agregar 250 µL de Cloroformo y dar vortex.
4. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
5. Tomar la fase acuosa y pasar a un Centricon YM-30 (Millipore, Co)
6. Agregar 1 mL de H<sub>2</sub>O.
7. Centrifugar 15 minutos a 5,000 rpm, repetir el proceso hasta obtener un volumen de aproximadamente 100 µL. Si se logra filtrar toda la muestra agregar 100 µL de H<sub>2</sub>O. Dar vortex por 1-2 minutos para despegar el ADN retenido en el filtro (poner un pedazo de papel en el fondo para evitar el contacto directo con el vortex).
8. Vaciar el contenido del Centricon YM-30 en el tubo de colección y centrifugar 1 minutos a 2,000 rpm.
9. Visualizar el producto purificado en gel de agarosa al 1.2%.
10. Alicuotar el producto purificado y mantener a -20°C.

## **VII. Actividad de α-amilasa extracelular de *Bacillus*.**

1. Preparar cajas de LB-almidón al 5%.
2. Estriar las cepas de *Bacillu subtilis* de interés una noche antes.
3. Incubar a 37°C por 12 horas.
4. Al siguiente día, tomar la caja abrirla y en la parte de adentro de la tapa adicionar unos gránulos de Yodo.
5. Cerrar la caja manteniendo la tapa hacia abajo.

6. Colocar la caja Petri en la parrilla a 37°C o más, con la tapa hacia abajo, hasta que los vapores de Yodo tiñan de azul todo el medio de cultivo. Los halos se forman cuando es degradado el almidón alrededor de las colonias por acción de las  $\alpha$ -amilasas y se observan translúcidos.

## 2. Medios y Soluciones

### Agar LB, para *Bacillus*

Para prepara un litro de agar LB agregar:

10g de Triptona

5g de Extracto de Levadura

0.5g de NaCl

15g de Agar

Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar y posteriormente, plaquear o almacenar a 4°C.

### Agar LB-almidón

Para determinación de la actividad de las  $\alpha$ -amilasas extracelulares de *Bacillus subtilis*.

Para prepara un litro agregar:

10g de Triptona

5g de Extracto de Levadura

0.5g de NaCl

15g de Agar

5g de almidón soluble

Pesar el almidón en un vaso de precipitado. Agregar agua y mezclar con una espátula hasta lograr una disolución homogénea. Cuando la solución sea uniforme, sin grumos, agregar el resto de los componentes y llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar y posteriormente, plaquear o almacenar a 4°C.

### Agar LB Miller, para *E. coli*

Para preparar un litro de agar LB Miller agregar:

10g de Triptona

5g de Extracto de Levadura

10g de NaCl

15g de Agar

Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar y posteriormente, plaquear o almacenar a 4°C.

### **Buffer TAE**

Para preparar 1 litro de Buffer TAE 5X agregar:

24.2g de TRIS-Base

5.7 mL de Ácido acético glacial

100 mL de EDTA 0.5M pH=8

Aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Para su uso en electroforesis, preparar una dilución 1:5 para obtener una concentración 1X (50mL de Buffer TAE 5X + 450 mL de H<sub>2</sub>O destilada).

### **IPTG**

Stock de 10mg/mL del sustrato isopropil-1-tio-β-D galactosido (IPTG) disuelto en 1 mL de H<sub>2</sub>O dd estéril, se almacena a -20°C. Se utilizan 10 µL por cada 20 mL de medio LB.

### **Medio LB, para *Bacillus***

Para preparar un litro de LB agregar:

10g de Triptona

5g de Extracto de Levadura

0.5g de NaCl

Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar y almacenar a 4°C.

### **Medio LB Miller, para *E. coli***

Para preparar un litro de LB Miller agregar:

10g de Triptona

5g de Extracto de Levadura

10g de NaCl

Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar y posteriormente almacenar a 4°C.

### Medio Mínimo para *Bacillus*

Medio Mínimo para la determinación de auxotrofías. Vaciar dentro de una botella de 1 litro:

17g de Agar

890 mL de H<sub>2</sub>O destilada y esterilizar.

Por cada litro agregar las siguientes soluciones estériles:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Sales de Bacillus 10X | 100 mL |
| Glucosa al 50%        | 10 mL  |
| MgSO <sub>4</sub> 1M  | 2.5 mL |
| FeCl <sub>3</sub>     | 2.0 mL |

### Suplementos nutricionales

Suplementos nutricionales utilizados frecuentemente en trabajos con bacterias. Son tales las soluciones stock que se agregan 5 mL por litro de medio para el nivel de suplementación normal.

| Nutriente  | Solución Stock (%) | Esterilizar | Notas                                       |
|------------|--------------------|-------------|---------------------------------------------|
| Glicina    | 0.20               | Autoclavear | -                                           |
| Histidina  | 0.31               | Autoclavear | -                                           |
| Triptófano | 0.41               | Filtrar     | Disolver la solución con unas gotas de NaOH |

### Medio Schaeffer

Para preparar un litro de medio agregar:

8g de Nutrient Broth

1g de KCl

0.13g de MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O

Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar pH a 7.2 y esterilizar.

Adicionar asépticamente las siguientes soluciones por Litro de medio:

1 mL de FeSO<sub>4</sub> 1mM

1 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M

1 mL de MnCl<sub>2</sub> 10mM

**Sales para Bacillus 10X**

140.0g de  $K_2HPO_4$

60.0g de  $KH_2PO_4$

20.0g de  $(NH_4)_2SO_4$

Llevar a 1 litro con  $H_2O$  destilada y esterilizar.

**Solución 1 para extracción de ADN plasmídico**

Para preparar 100mL de Solución 1 agregar:

5 mL de Tris-HCl 1M pH=8

2 mL de EDTA 0.5M pH=8

Llevar a 100 mL con  $H_2O$  destilada. Almacenar a 4°C.

**Solución 2 para extracción de ADN plasmídico**

Para preparar 50 mL de Solución 2 agregar:

5 mL de SDS 10%

1 mL de NaOH 10N

Llevar a 50 mL de  $H_2O$  destilada.

**Solución 3 para extracción de ADN plasmídico**

Acetato de Na o K 3M pH=5.5

**X-gal**

Stock de 20mg/mL de sustrato 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido (Xgal) disuelto en 1 mL de N-N'-dimetilformamida, se almacena a -20°C. Se utilizan 40  $\mu$ L del stock para 20 mL de medio LB.