

**Clonación y expresión del gen sintético de la
neurotoxina recombinante específica para
insectos del *Androctonus australis Hector*
(AaHIT) en *Escherichia coli***

Ediner Joel Fuentes Campos

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

Clonación y expresión del gen sintético de la neurotoxina recombinante específica para insectos del *Androctonus australis Hector* (AaHIT) en *Escherichia coli*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Ambiente y Desarrollo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ediner Joel Fuentes Campos

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Clonación y expresión del gen sintético de la neurotoxina recombinante específica para insectos del *Androctonus australis Hector* (AaHIT) en *Escherichia coli*

Ediner Joel Fuentes Campos

Resumen: La toxínología y la recombinación con fines biotecnológicos ha tomado importancia por los múltiples hallazgos e impactos en farmacia, agricultura y para reducir el impacto ambiental antropogénico. La AaHIT es una neurotoxina polipeptídica de 65-70 residuos de aminoácidos específica para insectos y producida por el *Androctonus australis*. El objetivo de este estudio fue el diseño, clonación, estandarización y transformación de las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y BL21 con la secuencias sintética de AaHIT y GFP. Esta secuencia formulada tiene un promotor regulado por IPTG para las secuencias de interés GFP y la AaHIT. La construcción se sintetizó y se clonó en el plásmido pUC57. La inducción para la producción de AaHIT mediante la activación del promotor regulado por IPTG se evaluó a 31° C y 37° C, pero no se encontró diferencias en la expresión. La transformación con el vector pUC57 fue positiva y se denota con la presencia del inserto por resistencia a medio con ampicilina. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se verificó la producción proteína reportera GFP de 37 kDa y a simple vista se corroboró la fluorescencia verde en las dos cepas, sin embargo, la intensidad y presencia fue mayor en las cepas de DH5 α . En cuanto a la AaHIT recombinante no se observó la banda esperada de 7kDa.

Palabras clave: Biología sintética, Biotecnología ambiental, Toxinología.

Abstrac: Toxinology and recombination with biotechnological purposes have become important for the many findings and impacts in pharmacy, agriculture and reduce anthropogenic environmental impact. The AaHIT neurotoxin is a polypeptide of 65-70 aminoacid residues specifies insect and produced by *Androctonus australis*. The objective was to design, clone, standardize and transfor *Escherichia coli* strains DH5 α and BL21 with synthetic AaHIT and GFP sequences. This sequence formulated has IPTG regulated promoter sequences of interest for GFP and AaHIT. The construction was synthesized and cloned into pUC57 plasmid. The induction AaHIT production by activating the promoter regulated by IPTG at 31 ° C and 37 ° C. The transformation with the vector pUC57 was positive and is denoted by the presence of the insert by restriction enzyme. By polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE protein GFP reporter production was verified at 37 kDa and at first glance the green fluorescence was confirmed in the two strains. The GFP band polyacrylamide gel was more intense in DH5 α strains. However, as to the recombinant AaHIT expected at 7kDa band was not observed.

Key words: Environmental biotechnology, Synthetic biology, Toxinology.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Portadilla | i |
| Página De Firmas | ii |
| Resumen..... | iii |
| Contenido..... | iv |
| Índice De Cuadros, Figuras Y Anexos..... | v |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 5 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 9 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 15 |
| 5. RECOMENDACIONES..... | 16 |
| 6. LITERATURA CITADA | 17 |
| 7. ANEXOS | 22 |

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | Página |
|---|--------|
| 1. Concentraciones de componentes de los geles separador y concentrador en la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. | 7 |
| 2. Concentraciones de componentes de los geles separador y concentrador en la electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%. | 8 |
| Figuras | Página |
| 1. Descripción del circuito genético propuesto para la producción de la toxina AaHIT en DH5 α | 9 |
| 2. Mapa del vector pUC57 que incluye la construcción sintética AaHIT-GFP. | 10 |
| 3. Colonias de células DH5 α -AaHIT y BL21-AaHIT en placas de agarosa con antibiótico ampicilina e IPTG. | 11 |
| 4. Gel de agarosa con presencia del vector transformado pAaGFP57. | 11 |
| 5. Gel de poliacrilamida al 15% en <i>E. coli</i> DH5 α y BL21 en inducción con IPTG a 37 °C con marcador de proteína de 100-10 kDa. | 12 |
| 6. Gel de poliacrilamida al 15% en <i>E. coli</i> DH5 α y BL21 en inducción con IPTG a 37 °C, con marcador de proteína de 100-10 kDa. | 13 |
| 7. Gel de poliacrilamida al 15% en <i>E. coli</i> DH5 α vs BL21 en inducción con IPTG a 37 °C, con marcador de proteína de 250-2 kDa. | 13 |
| 8. Gel de poliacrilamida al 15% en <i>E. coli</i> DH5 α vs BL21 en inducción con IPTG a 31 °C, con marcador de proteína de 250-2 kDa. | 14 |
| Anexos | Página |
| 1. Cuadro de abreviaturas | 22 |

1. INTRODUCCIÓN

Los animales pueden proveer material genético que puede ser aprovechado para el bienestar humano. Diversos organismos han sido estudiados, por mucho tiempo, con la finalidad de encontrar componentes farmacológicos nuevos. Estos incluyen la producción recombinante de compuestos bioquímicos que nuestro organismo no puede producir, tales como: aminoácidos, proteínas y antibióticos, así como metabolitos secundarios, hormonas y toxinas (Nielsen, 2013; Nielsen, Baeshen, Baeshen, Sheikh y Bora, 2014).

La ciencia encargada de estudiar e identificar beneficios que pueden tener las toxinas o venenos se denomina toxinología. Existen grupos de organismos principalmente insectos y artrópodos que han desarrollado formas de defensa y de obtención de alimentos exitosas, como la producción y utilización de venenos. Estos compuestos también son producidos y utilizados para luchar o competir por los alimentos, como la miel. En algunos casos son utilizados cuando los insectos se sienten amenazados por los seres humanos u otros depredadores (Muller, 2010).

Algunos de los compuestos importantes y estudiados comúnmente son los metabolitos secundarios, hormonas o toxinas. Estos ya son utilizados como insecticidas o repelentes en el mercado. Sin embargo, existen otros desconocidos que pueden tener características de importancia para el ser humano (Froy, Zilberberg, Chejanovsky, Anglister, Loret y Shaanan, 2000; Haase, Sciocco-Cap y Romanowsky, 2015; Inceoglu et al., 2001; Taniai, Inceoglu y Hammock, 2002; Shim et al., 2013). El veneno, en particular de los escorpiones, está formado regularmente por un complejo mixto de: péptidos, nucleótidos, mucoproteínas, aminas biógenas, enzimas y sustancias todavía desconocidas (Possani, Becerril, Delepierre y Tytgat, 1999; Tuuri y Reynolds, 2011).

Particularmente las toxinas presentes en los escorpiones son en su mayoría polipéptidos que tiene una composición de pequeños péptidos y una alta cantidad de puentes disulfuro. Estas características le brindan la capacidad de ser estables y resistentes a la desnaturalización. Estos venenos también funcionan como mecanismos para su alimentación y defensa (Martin-Eauclaire, 2013; Pedraza y Possani, 2013).

A través de la picadura del escorpión a su presa, los polipéptidos se unen a la membrana de las células nerviosas y provocan la modulación en la actividad de los canales de iones presentes en esta membrana. Esto ocasiona la excitación de la membrana de una forma específica que distingue entre los mamíferos e insectos (Gordon, Savarin, Gurevitz y Zinn-Justin, 1998). Las neurotoxinas que afectan a los canales de sodio se han dividido en las clases: alfa y beta, estas afectan a la inactivación y la activación de la corriente de sodio en las membranas neuronales, respectivamente (Froy et al., 2000).

Las neurotoxinas beta se dividen en dos grupos específicos de acción en insectos, la forma excitadora y la depresiva. Las toxinas excitadoras son dominantes y su efecto es un pequeño descanso en la despolarización de la membrana axonal que permite la abertura de los canales de sodio y que puede explicar la actividad excitadora. Las acciones sintomáticas de los dos grupos son opuestas (Lester, Lazarovici, Pelhate y Zlotkin, 1982; Pelhate y Zlotkin, 1982; Zlotkin et al., 1985).

De este modo, según sus propiedades funcionales, las toxinas beta se han agrupado en tres formas. En primer lugar (i) las clásicas que sólo son activas sobre canales de sodio (Na) en mamíferos; (ii) aquellas que son selectivas a insectos que pueden poseer una función depresora o excitadora y (iii) las activas tanto en mamíferos como en insectos (Bosmans Martin-Eauclaire y Tytgat, 2007; Bosmans, Martin-Eauclaire y Swartz, 2008; Gurevitz y Gordon, 2007; Martin-Eauclaire, Abbas, Céard, Rosso y Bougis, 2013; Pedraza-Escalona y Possani, 2013; Possani et al., 1999; Zhang et al., 2012).

En particular, los escorpiones del género *Androctonus* tienen una distribución geográfica entre África Sahariana y la India. El género *Androctonus* cuenta con 18 especies distribuidas en dicha zona. Una de estas especies el *Androctonus australis* (Aa) posee dos subespecies descritas en el Magreb: *australis* en Argeria (hector Morph) (AaH) y en Túnez: *garzonii* (AaG), todos pertenecientes a la familia Butidae (Dupre, 2007).

Precisamente, la especie *Androctonus australis* produce la toxina beta *Androctonus australis Hector* Insect Toxin (AaHIT) la cual tiene un forma excitadora altamente específica para insectos. Ésta causa parálisis contractiva e induce la descarga repetitiva en los nervios motores debido a un aumento en la corriente de sodio. Esta posee un tamaño que varía entre 65-70 residuos de aminoácidos (AA) y tiene cuatro puentes de disulfuro y una región carbono (C) terminal (Lima et al., 1989; Gordon et al., 1998; Lester et al., 1982; Pelhate y Zlotkin, 1982; Zlotkin, Miranda, Kupeyan y Lissitzk, 1971).

La AaHIT posee dos característica estructurales importantes; la extensión de la región C terminal y la formación de un puente disulfuro diferente que es adyacente a la superficie conservada hidrofóbica y que está implicada en la actividad tóxica. Por lo tanto, las diferencias en la especificidad en los diversos animales está determinada por la posición del péptido C terminal con respecto a la superficie hidrofóbica. Loret y colaboradores (1990), sugieren que al entrar en contacto con el canal de sodio en el insecto se forma una α -hélice complementaria en la región del C terminal específicamente de los residuos AA 51-60 (Darbon et al., 1982; Darbon, Weber y Brawn, 1991; Fontecella-Camps, Almasy, Suddath, Watt y Bugg, 1980; Fontecella-Camps, 1989; Loret, Mansuelle, Rochat y Granier, 1990; Martin, 1989).

La toxicidad que puede causar la AaHIT en insectos ha sido refutada por varios investigadores. Por ejemplo: Zlotkin y sus colaboradores en el 2000, afirmaron que dicha toxina no tiene aplicaciones agrícolas al realizar ensayos con aplicaciones orales y tópicas en larvas de lepidópteros. Debido a esto, los investigadores dirigieron su atención en el diseño y construcción de un baculovirus para la expresión específica de esta toxina de manera intracelular. Estos baculovirus fueron analizados bajo condiciones controlados y han resultado exitosos en el control de diversos insectos (Fishman, Herrmann, Gordon y

Zlotkin, 1997; Herrmann, Fishman y Zlotkin, 1990; Ji, Liu, Li y Zhu, 2002; Taniai, Inceoglu y Hammock, 2002; Zlotkin, Fishman y Elazar, 2000).

De este modo, utilizar baculovirus sustituye el uso de la toxina pura debido a la facilidad de ingreso, reproducción y translocación de compuestos en el metabolismo de insectos. También, los baculovirus recombinantes son exitosos ya que permiten la producción de neurotoxinas de tamaño pequeño que son muy específicas. Estas no tienen la capacidad de afectar a los humanos, ni a las plantas, por lo que puede ser efectivo en el control biológico de insectos. Los baculovirus son vectores versátiles en la producción de proteínas para investigaciones básicas y en aplicaciones médicas. Como vectores de expresión, estos poseen numerosas ventajas, incluyendo las tasas extremadamente altas en la expresión de productos con actividad biológica auténtica. A pesar de ello, estos virus recombinantes producen cantidades mínimas para eliminar al insecto, pero no para obtener altas cantidades del péptido crudo. Este sistema de producción se detiene cuando las células eucarióticas mueren (Miller, 1997; O'Reilly et al., 1961).

Por consiguiente, la eficacia de los baculovirus recombinantes, expresando AaHIT y otras neurotoxinas polipéptidicas se puede atribuir a su capacidad para proporcionar la translocación continua del gen que expresa la toxina en el insecto y distribuirlo en su sistema nervioso central. Sin embargo, la expresión de esta toxina en células de insectos es relativamente baja (McCutchen et al., 1991; Zlotkin et al., 2000).

En investigaciones hechas por McCutchen y colaboradores (1991) se utilizaron baculovirus recombinantes conteniendo la secuencia codificante para AaHIT, y evaluando la expresión de este en larvas de palomilla. El estudio demostró que la expresión procariótica tiene una toxicidad específica en las células de insectos y no en células humanas. Además, curiosamente, el sitio de acción de AaHIT en los canales de sodio de insectos y muchos de sus efectos fisiológicos de AaHIT son similares a los insecticidas piretroides (Gordon et al., 1992; Inceoglu et al., 2001; McCutchen et al., 1997).

En el 2009, Wu y sus colaboradores modificaron en China una planta de algodón (*Gossypium hirsitium*) transgénica agregando genes de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta planta había sido transformada con el gen codificante para la toxina AaHIT. Estas plantas transgénicas homocigotas mostraron resistencia a las larvas del gusano del algodón (*Heliothis armigera*) con una efectividad entre el 44 y el 98% debido al efecto tóxico del péptido sobre ellas. El estudio demostró que puede ser un reemplazo en la utilización de la toxina Cry en transgénicos.

Estudios realizados utilizando diferentes insectos como: moscas en etapa larval (*Sarcophaga* sp.), escarabajos en etapas larval y adulto (*Tenebrio* sp.), cucaracha en etapa adulta (*Periplaneta* sp. y *Blatella* sp.), langostas en etapa larval y adulta (*Locusta* sp.) y grillos en etapa larval y adulta (*Gryllus* sp. y *Acheta* sp.) se demostró que la AaHIT puede producir parálisis en insectos inhibiendo así su propagación en el ambiente y comprobando la selectividad de la AaHIT. Sin embargo, una gran cantidad de estudios comprueban la eficiencia en la acción del péptido sobre lepidópteros (Inceoglu et al., 2001; Zlotkin et al., 1971; Zlotkin et al., 1994; Zlotkin et al., 2000).

En todo caso las plagas de insectos causan daños a muchos cultivos reduciendo la productividad. Estos se ven favorecido por los monocultivos en áreas extensas y el uso intensivo de fertilizantes. Además de manera indirecta contribuyen a la contaminación del medio ambiente y a la pérdida de diversidad biológica debido al uso de insecticida para su control (Metcalf, 1996; Pimentel, 1976; Oerke y Dehne, 2004).

Cabe mencionar que los insecticidas que se utilizan para controlar estas plagas están fabricados a base de productos sintéticos que causan daños severos a la biodiversidad, contaminando los suelos y las fuentes de agua. La fabricación de éstos, contribuye al aumento de gases de efecto invernadero. Además, ocasionan un impacto con intoxicaciones de formas tóxicas u orales en los seres vivos (Aktar et al., 2008; Relyea, 2005).

La pérdida de la diversidad biológica también es uno de los principales efectos de la utilización de insecticidas de origen sintético. Tanto los herbicidas como los insecticidas tienen el potencial de causar dramáticos cambios en las comunidades ecológicas (Relyea, 2005). La mayoría de los insecticidas no son específicos, sino de amplio espectro, provocando que insectos benéficos e importantes en las cadenas tróficas sean afectados.

La producción de AaHIT utilizando cepas bacterianas puede ser una alternativa a la utilización de insecticidas convencionales. La integración de este circuito en un sistema biológico a través de técnicas de biología molecular y sintética podría convertirlo en un sistema eficaz en control biológico de insectos que son plagas para humanos y para los alimentos. Los beneficios de un circuito sintético radican en la selectividad y especificidad que pudiera tener al interconectarse con otros sistemas genéticos como por ejemplo: producción de ferohormonas con la finalidad de atraer a otros insectos. Los objetivos específicos de la investigación fueron: diseñar y clonar la secuencia sintética codificante para las proteínas GFP (Proteína verde fluorescente) y AaHIT en el plásmido pUC57, determinar la presencia de los genes sintéticos en el vector mediante ensayos con antibióticos e inducción de la producción de las proteínas GFP y AaHIT haciendo uso de IPTG (Azufre isopropiltiogalactósido) en cepas de *Escherichia coli* DH5 α y B121.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y construcción circuito genético sintético. Inicialmente para el estudio se hizo una búsqueda de secuencias aminoacídicas específicas del péptido AaHIT y de la proteína GFP en el GenBank, con código M27705.1. A partir de la descripción de las secuencias de aminoácidos se determinaron las secuencias de los mRNAs reportadas y se revisaron las secuencias en el repositorio de genes de IGEM. El circuito fue sintetizado por la empresa BIOMATIK (Canadá) y fue introducido en el plásmido pUC57, que posee el gen de resistencia a ampicilina (Amp) para su uso posterior en laboratorio.

Las técnicas de biología molecular que se describen a continuación fueron realizadas en el Laboratorio de Biología Sintética y Ciencias Genómicas de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México. Además se utilizaron los diversos protocolos establecidos en el laboratorio y los de Torres, (2015).

Transformación bacteriana con el circuito sintético. Para las transformaciones se utilizó las cepas de *E. coli* DH5- α supE44 Δ lacU169 (80 lacZdeltaM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 y cepa *E. coli* BL21 B F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) [malB⁺]_{K-12}(λ^S), el vector utilizado es el plásmido pUC57.

Preparación de células competentes *E. coli*. Las células de DH5 α y BL21 fueron inoculadas en medio LB (Luria Bertani) líquido sin antibiótico y se incubaron a 37 °C, durante 12 horas con agitación continua a 250 rpm. Hasta que se alcanzó una concentración 5 x 10⁸ células por mililitro. Posterior a esto se centrifugaron y se re suspendieron en solución de cloruro de calcio a 0.1 M. Este proceso se repitió un vez más y se almacenaron a 4 °C.

Preparación de ADN plasmídico. La compañía BIOMATIK suministró el plásmido conteniendo el circuito sintético de forma liofilizada, para asegurar su estabilidad en el proceso de envío. Inicialmente el tubo conteniendo el plásmido liofilizado (10 μ g) se resuspendió en 100 μ l de agua libre de nucleasas para alcanzar una concentración final de 100 ng/ μ l. Posteriormente se preparó una solución de trabajo a una concentración final de 10 ng/ μ l y se almacenó a -20 °C.

Transformación de *E. coli* DH5 α y BL21. Las bacterias competentes almacenadas a 4 °C se mezclaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente enfriado con 1 μ l de la solución de plásmido que contiene la secuencia sintética. Esta mezcla se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente a la mezcla se le aplicó un choque térmico a 42 °C por 1 min. Para verificar la transformación con el plásmido, las células bacterianas

fueron inoculadas en medio LB agar con presencia del antibiótico Amp. Esto se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Aumento de biomasa de clones transformados. Las células que crecieron en el medio LB sólido con el antibiótico ampicilina se consideraron como clones transformados y fueron subcultivados nuevamente tanto en medio LB líquido como sólido que contenía el antibiótico ampicilina a una concentración de 50 µg/ml.

Mini preparación del ADN plasmídico. Lisis alcalina (MiniPrep). Para la extracción del plásmido pUC57 se utilizaron 1.5 mL del cultivo de células en medio LB líquido. Este fue centrifugado a 14,000 rpm durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de Solución I (HCl a 25 mM, EDTA y Ácido etilendiaminotetraacético) a 10 mM a un pH de 8.0) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se adicionó 200 µl de la Solución II (SDS-dodecilsulfato de sodio al 1 % , NaOH a 0.20 N) y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se adicionó 200 µl de solución III (acetato de potasio y ácido acético) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación el tubo se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se adicionó 2 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos a -20 °C. Luego se sometió a centrifugación a 14,000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante con puntillas de micro pipetas. El pellet se secó a 37 °C por 5 min en una incubadora. Al final se agregaron 20 µl Agua MiliQ (con RNAasa) y se resuspendió en vortex. La muestra fue sometida a una electroforesis en un gel de agarosa.

Evaluación de ADN plasmídico obtenido a partir de clonas transformadas. El ADN plasmídico de las células transformadas se corrió en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando buffer de corrida SB (Borato de sodio) 1X. Como escalera molecular se utilizó 3 µl de buffer marcador lambda T. La corrida se realizó a 200 V por aproximadamente 20 min. Tanto el buffer marcador, el buffer de corrida y gel de agarosa se prepararon de acuerdo a Sambrook y Russel (2006). El volumen de ADN plasmídico que se corrió fue de 3 µl. Finalmente el gel se tiñó utilizando bromuro de etidio y se observó en un transiluminador.

Inducción y evaluación de la expresión de la proteína. Para el cultivo madre se utilizó LB líquido el cual se inoculó con las colonias de las cepas BL21 y DH5α procedentes del medio LB agar. El medio líquido inoculado se incubó a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se transfirieron 20 µl de cultivo a tubos de ensayo con 3 ml LB y 3µl de Amp. Los tubos se colocaron en agitación a 250-300 rpm por toda una noche, dentro de una incubadora a 37 °C. Posteriormente se preparó una solución madre de IPTG a una concentración final de 1.0 mM.

Para el proceso de inducción se mezclaron 30 µl de la solución madre de IPTG con 100 µl de cultivo de células BL21 y DH5α, por duplicado. Ambas replicas se incubaron en agitación a 200 rpm durante tres horas, pero una de ellas se colocó a 37 °C y la otra a 31°C. Esto con el objetivo de observar si existían diferencias en el proceso de inducción a causa de los cambios de temperatura.

Evaluación de la proteína. Para evaluar la producción de las proteínas (GFP y AaHIT) que conforman el circuito sintético se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con detergente sodio duodecil sulfato (SDS-PAGE/SADS PAGE) a 15 y 20%, debido a que el tamaño de las proteínas es diferente, la GFP tiene un tamaño de 35 kDa y la AaHIT de 7 kDa.

Para ello se preparó dos geles de poliacrilamida en dos fases una capa de concentración y la otra de separación, utilizando los reactivos y concentraciones descritas en el cuadro 1 y 2. Inicialmente se colocó 20 ml de gel separador y una vez solidificado se colocó 10 ml del gel concentrador. Como buffer de corrida se utilizó PBS 1X. Para lisis bacteriana se tomaron 1.5 µl de las muestras inducidas que fueron centrifugadas por 3 min a 8,000 rpm. Se disolvió la pastilla por vortex y se calentó a 100 °C por 5 min. Las muestras previo a cargarse en el gel se mezclaron con 25 µl buffer laemmli 1:1 (2 X Mini-PROTEAN® de BIORAD) y 100 µl de PBS (Tampón fosfato salino) 1X (10 % de 1 M de TRIS a pH de 6.8, 10% de SDS, 0.1% de 2-mercapto, 10 % de glicerol, 68% de agua destilada y 1% de rojo de fenol).

Cuadro 1. Concentraciones de componentes de los geles separador y concentrador en la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

| Reactivos | Separador | Concentrador |
|-------------------------------|------------------|---------------------|
| Solución A (Acrilamida) | 5 ml | 1.33 ml |
| Solución B (Tris-HCl pH 8.8) | 3.75 ml | |
| Solución C (SDS) | 100 µl | 100 µl |
| Solución D (Tris-HCl 6.8 pH) | | 1.25 ml |
| H ₂ O Destilada | 1.10 ml | 7.2 ml |
| 10% PSA(Persulfato de amonio) | 40 µl | 100 µl |
| Temed* | 8.3 µl | 5 µl |
| Total | 10 ml | 10 ml |

* N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

Fuente: Protocolos estandarizados del laboratorio de ciencias genómicas de la FCB-UANL.

Cuadro 2. Concentraciones de componentes de los geles separador y concentrador en la electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%.

| Reactivos | Separador | | Concentrador | |
|--------------------------------|------------------|-----------|---------------------|-----------|
| Solución A | 9.01 | ml | 1.33 | ml |
| Solución B | 7.5 | ml | | |
| Solución C | 200 | μl | 100 | μl |
| Solución D | | | 1.25 | ml |
| H ₂ O Destilada | 3.18 | ml | 7.2 | ml |
| 10% PSA (Persulfato de amonio) | 100 | μl | 100 | μl |
| Temed* | 10 | μl | 5 | μl |
| Total | 20 | ml | 10 | ml |

* N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

Fuente: Protocolos estandarizados del laboratorio de ciencias genómicas de la FCB-UANL.

El gel se corrió a 100 voltios hasta que el frente de corrida llegó casi al borde inferior del gel. Una vez concluida la corrida el gel se tiñó con azul de coomassie-R-250 a 0.2% por 20 min, para quitar el exceso de colorante y brindar contraste. El gel se colocó en una solución decolorante (7% ácido acético y 5% de metanol) durante 12 horas.

Finalmente el gel fue fotografiado y se revisó la ubicación de las proteínas de acuerdo al peso molecular. Los marcadores de peso molecular de proteínas utilizados fueron Precision Plus Protein Standards #161-0373 de 10-250 kDa y Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards #161-0377 de 2-250 kDa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de circuito sintético. El circuito genético está compuesto por las partes que se describen a continuación. (Figura 1). La información sobre las biopartes utilizadas se obtuvieron de Registry-IGEM Competition (http://parts.igem.org/Main_Page).

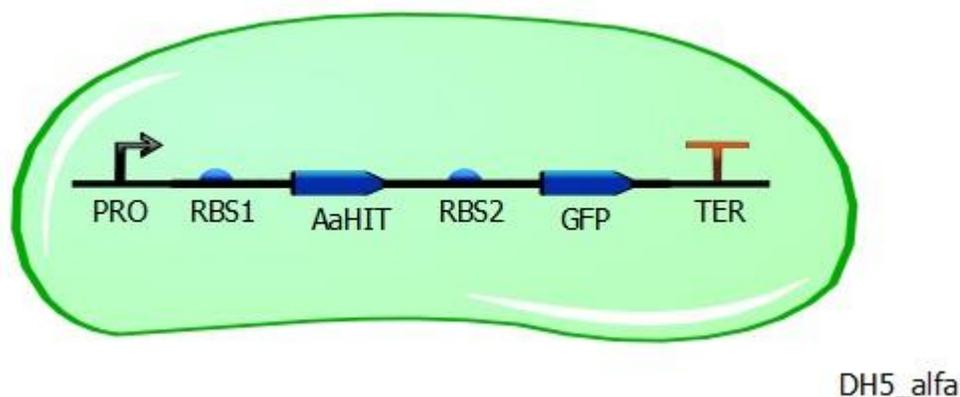


Figura 1. Descripción del circuito genético propuesto para la producción de la toxina AaHIT en DH5 α .

Promotor (PRO). Se utilizó un promotor con una región reguladora invertida controlada por LacI (Lactosa-Inductor) e híbrido lambda de PI (BBa_R0011). Esta puede funcionar de dos formas; como represor: LacI, inhibidor de Lac. o como inductor, utilizando IPTG en *E. coli* DH5 α y BL21. El IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) induce la transcripción a partir de promotores regulados por el represor de LacI. El tamaño del promotor es de 55 pares de bases (pb).

Sitio de Unión al Ribosoma (RBS). Para el circuito se utilizó un RBS creado por el equipo IGEM Antiquity en 2003 (BBa_B0034) que tiene una distancia de 12 pares de bases.

Secuencia codificante de la proteína (AaHIT). La secuencia completa del gen AaHIT tiene una longitud de 210 pb y la proteína tiene un peso molecular de 35kDa. Esta fue propuesta por Matsumoto y colaboradores en el 2014.

Gen reportero GFP. Este gen reportero codifica una proteína verde fluorescente con un peso molecular de 35kDa (BBa_E0044). Se obtuvo de medusas victoria *Aequorea* sp. de

tipo salvaje. El gen reportero forma parte del circuito para identificar la producción de la toxina AaHIT.

Terminador (TER). El terminador fue creado por John Anderson del laboratorio Arkin en la Universidad de California en Berkeley en el 2007 (BBa_J61048). Tiene un tamaño de 113 pb.

Diseño del vector. El circuito diseñado utilizando las diferentes secuencias fue sintetizado por la empresa BIOMATIK y clonado en el vector pUC57 que consta de los siguientes sitios de restricción: EcoRI al inicio de la construcción, HindIII; que separa el gen del AaHIT con el de GFP y PsT1 al final del transcripto. El porcentaje de uniones entre Citosinas y Guaninas corresponde a 41% y el de Timina con Adenina a 59% (Figura 2).

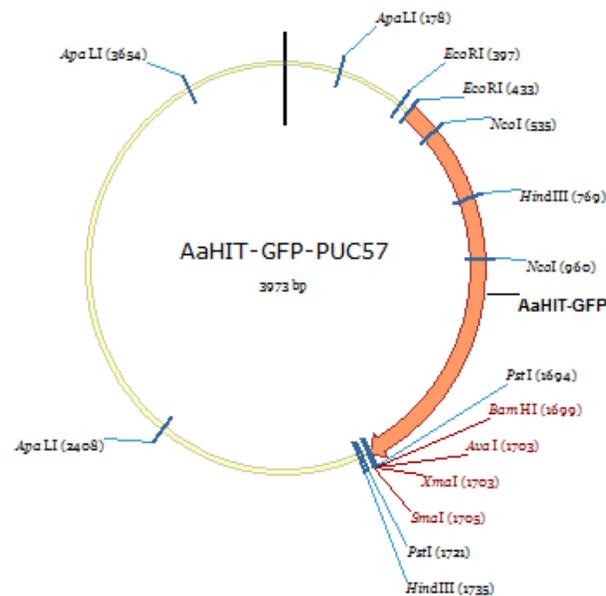
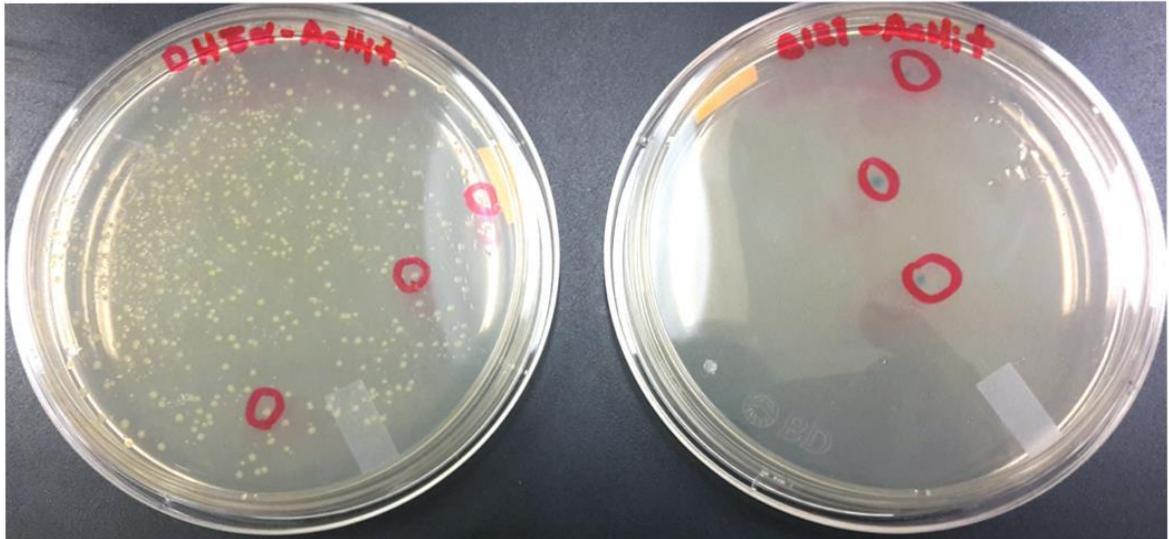


Figura 2. Mapa del vector pUC57 que incluye la construcción sintética AaHIT-GFP.

Transformación bacteriana con el circuito sintético y evaluación de ADN plasmídico obtenido a partir de clonas transformadas. La transformación de las cepas BL21 y DH5 α , fue exitosa. En ambos casos las células crecieron en el medio de cultivo conteniendo el antibiótico ampicilina y además presentaron el color verde de la proteína fluorescente GFP, cuya producción fue inducida con IPTG (Figura 3). Las células que crecieron en ausencia de IPTG mostraron también la presencia del gen reportero y se observaron de color azul. El número de células transformadas fue mayor en el caso de la cepa DH5 α que en las BL21.



DH5Alfa-AaHIT

BL21-AaHIT

Figura 3. Colonias de células DH5 α -AaHIT y BL21-AaHIT en placas de agarosa con antibiótico ampicilina e IPTG.

La presencia del vector pAaGFP57 dentro de las cepas fue comprobado por medio de extracción del plásmido y posterior electroforesis (Figura 4). El vector se observa presente en todas las cepas de DH5 α , sin embargo, dentro de las cepas de BL21 solo una de las 3 cepas aceptaron el vector pAaGFP587.

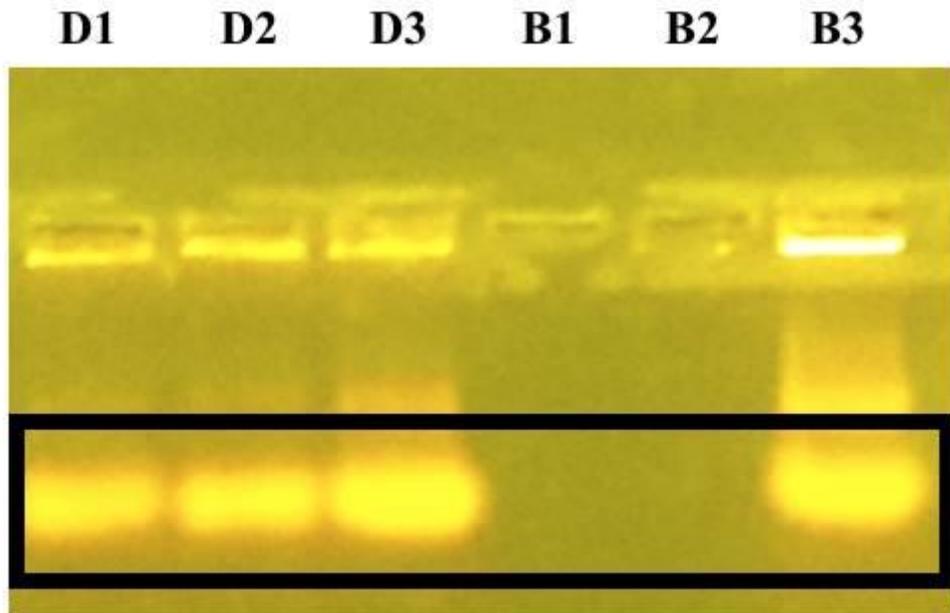


Figura 4. Gel de agarosa con presencia del vector transformado pAaGFP57. Este muestra la presencia ADN del vector pAaGFP57 extraído a partir de cultivos líquidos de las cepas

BL21 y DH5 α . **D1**, **D2** y **D3**: ADN extraído de colonias *E. coli* DH5 α positivas a la transformación con pAaGFP57 **B1** y **B2**, colonias *E. coli* BL21 negativas a la presencia del vector pAaGFP-57: **B3**, colonias *E. coli* BL21 positivas a la presencia del vector pAaGFP57.

Inducción, expresión y evaluación de las proteínas GFP-AaHIT. La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compacta las muestras (en el gel superior o compactador) y luego las separan (en el gel inferior o separador) (Torres, 2014). En el caso de la proteína GFP fue posible observar la banda de aproximadamente 35 kDa que representa la expresión de dicha proteína tanto en las células DH5 α , así como en la BL21 (Figura 5, 6, 7 y 8).

En cuanto a la inducción de la proteína se probaron geles de poliacrilamida de 15 y 20%. Esto debido a que el rango de las dos proteínas que son de 35 kDa GFP y la AaHIT de 7 kDa están estandarizados en geles con dichas concentraciones (Figura 6).

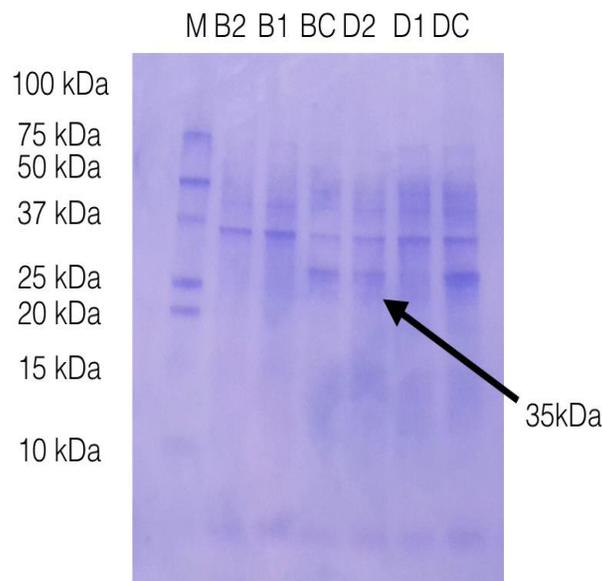


Figura 5. Figura de gel de poliacrilamida al 15% en *E. coli* DH5 α y BL21 en inducción con IPTG a 37 °C con marcador de proteína de 100-10 kDa. **M.**, Marcador de proteína de 10- 250 kDa (Biorad Precisión Plus Protein™ All Blue Standards); **DC**, Cepa de DH5 α sin inducción con IPTG; **D1** y **D2**, DH5 α en inducción a 1 mM IPTG; **BC**, cepa de BL21 sin inducción con IPTG; **B1** y **B2**, cepas de BL21 en inducción a 1 mM de IPTG. Proteína GFP a 35 kDa.

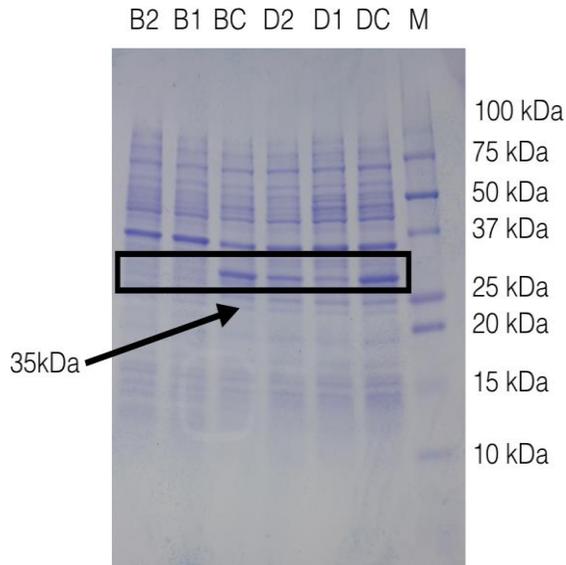


Figura 6. Gel de poliacrilamida al 15% en *E. coli* DH5 α y BL21 en inducción con IPTG a 37 °C, con marcador de proteína de 100-10 kDa. **M.**, Marcador de proteína de 250 kDa-10 kDa (Biorad Precisión Plus Protein™ All Blue Standards); **DC**, Cepa de DH5 α sin inducción con IPTG; **D1** y **D2**, DH5 α en inducción a 1 mM IPTG; **BC**, cepa de BL21 sin inducción con IPTG; **B1** y **B2**, cepas de BL21 en inducción a 1 mM de IPTG. Se puede observar la proteína GFP a 35 kDa.

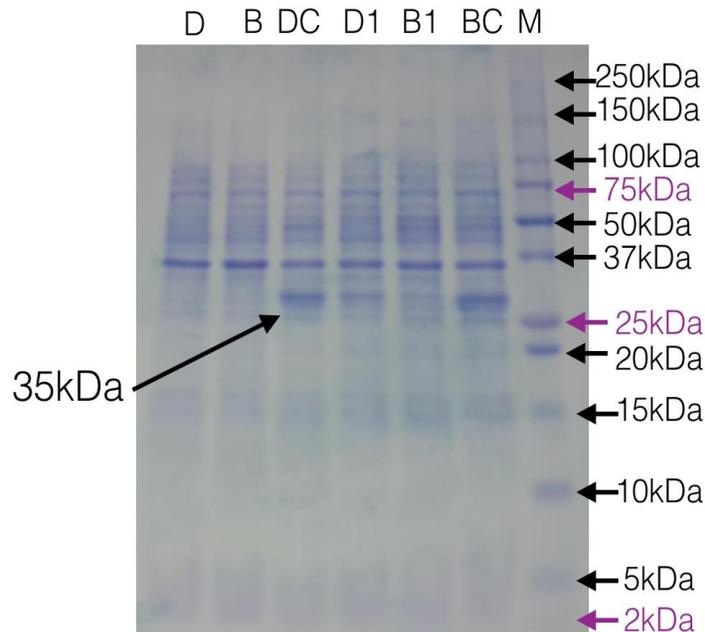


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 15% en *E. coli* DH5 α vs BL21 en inducción con IPTG a 37 °C, con marcador de proteína de 250-2 kDa. Comparación de producción de proteínas a 37 °C por 180 min. **M.**, Marcador de proteína de 250 kDa a 2 kDa (Biorad Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein); **D**. Cepa de DH5 α sin presencia

de plásmido: **B**. Cepa BL21 sin presencia de plásmido; **DC**, DH5 α sin IPTG; **D1**, DH5 α con 0.1mM de IPTG; **B1**, Cepa de B121 con 0.1mM de IPTG; **BC**, BL21 sin IPTG.

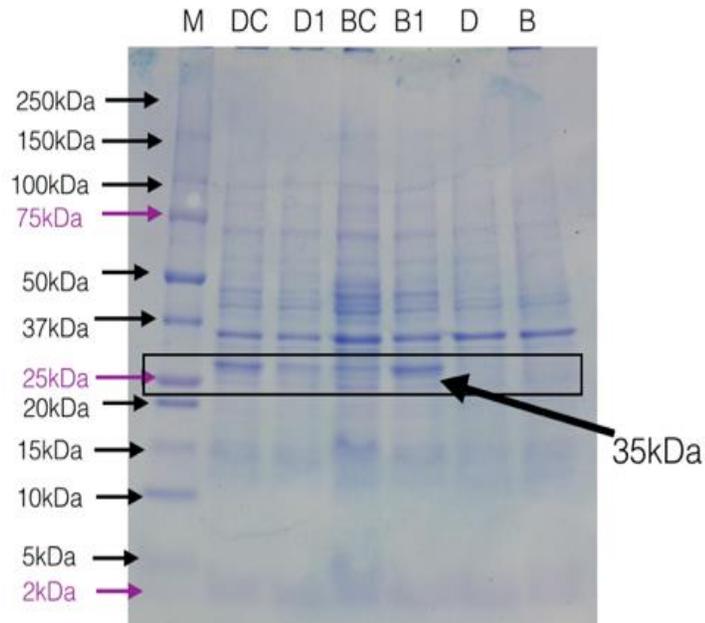


Figura 8. Gel de poliacrilamida al 15% en *E. coli* DH5 α vs BL21 en inducción con IPTG a 31 °C, con marcador de proteína de 250-2 kDa. Comparación de producción de proteínas a 31 °C por 180 min. **M.**, Marcador de proteína de 250 kDa a 2 kDa (Biorad Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein); **D**. Cepa de DH5 α sin presencia de plásmido; **B**. Cepa BL21 sin presencia de plásmido; **DC**, DH5 α sin IPTG; **D1**, DH5 α con 0.1mM de IPTG; **B1**, Cepa de B121 con 0.1mM de IPTG; **BC**, BL21 sin IPTG.

4. CONCLUSIONES

- Los genes sintéticos de GFP y AaHIT están presentes dentro del plásmido pUC57.
- Tanto las células competentes DH5 α como las BL21 pueden utilizarse para la transformación con circuitos sintéticos.
- En las células transformadas únicamente hubo expresión de la proteína GFP presente en el circuito sintético.
- La concentración de los geles de poliacrilamida es un aspecto importante para la visualización clara de las bandas de las proteínas que se expresaron en el circuito sintético.
- No existen diferencias observadas en la producción de la proteína GFP según los geles de poliacrilamida por la variación de temperatura.
- La cepas DH5 α por su versatilidad en condiciones de laboratorio parecen expresar mejor la proteína GFP a comparación de BL21.
- Aunque la AaHIT no está presente en los ensayos no podemos denegar o corroborar que las bacterias no tengan la capacidad productora de esta neurotoxina, debido a que los genes que codifican para la AaHIT y GFP están dentro de un marco lectura codificado por un promotor; esto aumenta las probabilidades de que la AaHIT también se encuentre en la muestra.
- El IPTG no tiene influencia en la producción de la GFP.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar los contactos debidos, para tener anticuerpos prediseñado en el 2010 de AaHIT de la investigación “Transgenic cotton expressing synthesized scorpion insect toxin AaHIT gene confers enhanced resistance to cotton bolworm (*Heliothis armigera*) larvae.
- Realizar secuenciación del plásmido y secuencia del circuito para revisar posibles modificaciones postraduccionales.
- Replicar ensayos con otras cepas bacterianas para estandarizar protocolos en biología sintética.
- Utilizar métodos alternos como la ELISA o el western blot que permitan confirmar la expresión de la toxina AaHIT.
- Utilizar el método para la purificación de la neurotoxina por GST o de fusión de proteína.
- Estandarizar los protocolos de biología sintética en el laboratorio de microbiología ambiental para poder continuar con la experimentación en esta temática.
- Equipar y abastecer de reactivos el laboratorio de microbiología ambiental para replicar y realizar investigaciones en biología molecular y biología sintética
- Introducir en el pensum académico de Zamorano una clase de biología celular y molecular que permita aprender los conceptos básicos y desarrollar más investigación en el área.

6. LITERATURA CITADA

- Aktar, W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A., y Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories*, 13(1), 141.
- Bosmans F, Martin-Eauclaire, M.F. y Tytgat J.; (2007). Differential effects of five 'classical' scorpion betatoxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 218(1):45–51.
- Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M., y Swartz, K. (2008). Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 456(7219), 202-208.
- Coakley, S.M., Scherm, H., y Chakraborty, S. (1999). Climate Change and Disease Management. *Ann. Rev. Phyto.*, 37:399-426.
- Cooping, R.T., y Menn J.J., (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.*, 56:651-676.
- Darbon, H., Weber, C. y Brawn, W. (1991). Two dimensional ¹H nuclear magnetic resonance study of AaH IT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis* Hector. Sequential resonance assignments and folding of the polypeptide chain, *Biochemistry*, 30:1836–1844.
- Darbon H., Zlotkin, E., Kopeyan C., Van Rietschoten J. y Rochat, H., (1982). Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis* Hector, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 20:320–330.
- Dehesa-Davila, M y Possani, L.D (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32, 1015-1018.
- Dupré, G., (2007). *Conspectus Genericus Scorpionorum 1758–2006 (Arachnida: Scorpiones) (20th ed.)*. Huntington.
- Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M. y Zlotkin, E. (1990). A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry*,

29:5941-5947.

- Fonticella-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. y Bugg, C.E. (1980). Three dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 6496–6500.
- Fontecella-Camps. J.C. (1989). Three-dimensional model of the insect- directed scorpion toxin from *Androctonus australis Hector* and its implications for the evolution of scorpion toxins in general, *J. Mol. Evol.* 29: 63–67
- Froy, N., Zilberberg, N., Gordon, D., Turkov, N., Gilless, N., Stankiewicz, ... Gurevitz, M. (1999). The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins, *J. Biol. Chem.* 274:5769–5776.
- Froy, O., Zilberberg, N., Chejanovsky, N., Anglister, J., Loret, E., y Shaanan, B. (2000). Scorpion neurotoxins: structure/function relationships and application in agriculture. *Pest Management Science*, 56(5), 472-474.
- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M. y Zinn-Justin, S. (1998). Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J Toxicol Toxin Rev.*, 17:131-159.
- Gurevitz, M. y Gordon, D. (2007). The insecticidal potential of scorpion b-toxins. 49, 473–489.
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., y Romanowski, V. (2015). Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230-2267.
- Harper, S. y Speicher, D. (2011). Purification of proteins fused to glutathione s(transferase). *Methods Mol Biol.*; 681:259-280.
- Inceoglu, A., Kamita, S., Hinton, A., Huang, Q., Severson, T., Kang, K. y Hammock, B. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest. Manag. Sci.*, 57(10), 981-987.
- Ji, S., Liu, F., Li, E., y Zhu, Y. (2002). Recombinant scorpion insect toxin AaIT kills specifically insect cells but not human cells. *Cell Res*, 12(2); 143-150.
- Lester, D., Lazarovici, P., Pelhate, M., y Zlotkin, E. (1982). Purification, characterization and action of two insect toxins from the venom of the scorpion *buthotus judaicus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure And Molecular Enzymology*, 701(3); 370-381.
- Lima, M. E. de, Martin-Eauclaire, M. F., Hue, B., Loret, E., Diniz, C. R., y Rochat, H. (1989). On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry*, 19(4), 413-422.

- Loret, E.P., Mansuelle, P., Rochat, H. y Granier, C. (1990). Neurotoxins active on insects: amino acid sequences, chemical modifications, and secondary structure estimation by circular dichroism of toxins from the scorpion *Androctonus australis* hector, *Biochemistry* 2: 1492–1501.
- Martin-Eauclaire, M., Abbas, N., Céard, B., Rosso, J. y Bougis, P. (2013). Androctonus Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels. *Springer Netherlands*, 1-25.
- Martin, M.F., Vargas, D., Rochat, H., in: Aubry A., Marband M., Vitaux B. (1989). Importance of the C-terminal amino acid residues on scorpion toxins activity, Second forum on peptides, Vol. 174, *Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.*, pp. 183–189.
- McCutchen, B. F., Choudary, P. V., Crenshaw, R., Maddox, D., Kamita, S. G., Palekar, N. ... Maeda, S. (1991). University California in Davis. *Bio/Technology* 9: 848–852
- McCutchen, B., Hoover, K., Preisler, H., Betana, M., Herrmann, R., Robertson, J., y Hammock, B. (1997). Interactions of Recombinant and Wild-Type Baculoviruses with Classical Insecticides and Pyrethroid-Resistant Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 90(5), 1170-1180.
- Matsumoto, R., Shimizu, Y., Howlader, M., Namba, M., Iwamoto, A., Sakai, H., y Hayakawa, T. (2014). Potency of insect-specific scorpion toxins on mosquito control using *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 680-683.
- Metcalf, R. (1996). Applied Entomology in the Twenty-First Century. *American Entomologist*, 42(4), 216-227.
- Miller LK (1997). The baculovirus, in *The Viruses*, ed by Wagner HF-C and Wagner RR, Plenum Press, New York.
- Muller, U. (2010). Insect Venoms. *Chemical Immunology and Allergy*. 95: 141-156.
- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 4(4):207-211.
- Nielsen, J., Baeshen, N., Baeshen, M., Sheikh, A., Bora, S., Ahmed, M., ... Redwan. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(4), 141.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., y Luckow, V.A. (1961). *Baculovirus Expression vectors: a laboratory manual*, WH Freeman, New York.
- Oerke, E. y Dehne, H. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275-285.

- Pedraza-Escalona, M. y Possani, L.D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front Biosci*; 18:572–87.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M. y Tytgat, J., (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem*. 264:287–300.
- Pelhate, M., y Sattelle, D. (1982). Pharmacological properties of insect axons: A review. *Journal of Insect Physiology*, 28(11), 889-903.
- Pelhate, M., y Zlotkin, E. (1982). Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Journal of Experimental Biology*, 97(1), 67-77.
- Petzoldt, C. y Seaman, Abby. (2012). Climate Change Effects on Insects and Pathogens. New York State Agricultural Extension Station.
- Pimentel, D. (1976). World Food Crisis: Energy and Pests. *Bulletin of The Entomological Society Of America*, 22(1), 20-26.
- Polis, G. (1990). The Biology of scorpions. Stanford, Calif.: Stanford University Press. Stanford, CA, xxvi, 587 pp.
- Possani, L., Becerril, B., Delepierre, M., y Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem*, 264(2), 287-300.
- Sambrook, J., y Russell, D. (2006). The condensed Protocols. From Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Protocols, 2006(1).
- Sambrook, J., y Green, M. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 3. 4ta Edición. Cold spring harbor laboratory press.
- Shim, H., Choi, J., Wang, Y., Tao, X., Liu, Q., y Roh, J., (2012). NeuroBactrus, a Novel, Highly Effective, and Environmentally Friendly Recombinant Baculovirus Insecticide. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 141-149.
- Taniai, K., Inceoglu, A., y Hammock, B. (2002). Expression efficiency of a scorpion neurotoxin, AaHIT, using baculovirus in insect cells. *Applied Entomology and Zoology*, 37(2), 225-232.
- Torres, Heber; (2015). Manual de Prácticas IGEM-CIDEB-UANL. 2da Edición. 71 pp.
- Tuuri, R. E., y Reynolds, S. (2011). Scorpion envenomation and antivenom therapy. *Pediatric emergency care*, 27(7), 667-675.

- Turkov, M., Rashi, S., Zilberberg, N., Gordon, D., Ben-Khalifa, R., Stankiewicz, M., ... Gurevitz, M. (1997). In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Express Purific* 10:123-131.
- Wu, J., Luo, X., Wang, Z., Tian, Y., Liang, A. y Sun, Y. (2007). Transgenic cotton expressing synthesized scorpion insect toxin AaHIT gene confers enhanced resistance to cotton bollworm (*Heliothis armigera*) larvae. *Biotechnology Letters*, 30(3), 547-554.
- Zhang, J.Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., ... Catterall, W.A., (2012). Mapping the interaction site for a b-scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem*; 287(36):30719–28.
- Zilberberg, N., Gordon, D., Pelhate, M., Adams, M.E., Norris, T., Zlotkin, E. y Gurevitz, M; (1996). Functional expression and genetic modification of an alpha scorpion neurotoxin. *Biochemistry*, 35:10215-10222.
- Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, Miranda, F. y Lissitzky, S. (1971). Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochimie*, 53(10), 1073-1078.
- Zlotkin, E., Fraenkel, G., Miranda, F. y Lissitzky, S. (1971). The effect of scorpion venom on blowfly larvae—A new method for the evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon*, 9(1), 1-2.
- Zlotkin, E., Kadouri, D., Gordon, D., Pelhate, M., Martin, M. y Rochat, H. (1985). An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240(2), 877-887.
- Zlotkin, E., Eitan, M., Pelhate, M., Chejanovsky, N., Gurevitz, M., y Gordon, D. (1994). Insect Specific Neurotoxins from Scorpion Venom that Affect Sodium Current Inactivation. *Toxin Reviews*, 13(1), 25-43.
- Zlotkin, E, E., Fishman, Y. y Elazar, M. (2000). AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie*, 82(9-10): 869-881.

7. ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de abreviaturas.

| Abreviatura | Nombre completo |
|--------------------|--|
| AA | Aminoácidos |
| Aa | <i>Androctonus australis</i> |
| AaG | <i>Androctonus australis garzonii</i> |
| AaH | <i>Androctonus australis Hector</i> |
| AaHIT | <i>Androctonus australis Hector</i> Insect Toxins |
| ADN | Ácido desoxirribunocleico |
| ADNc/ cDNA | Ácido desoxirribunocleico complementario |
| Amp | Ampicilina |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FCB | Facultad de Ciencias Biológicas |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GST | Proteína de fusión |
| IGEM | International Genetically Engineering Machine |
| IPTG | Azufre isopropiltiogalactósido |
| kDA | Kilodaltons |
| L | Litros |
| LB | Medio Luria Bertani |
| M | Molar |
| Min | Minutos |
| Mini-Prep | Minipreparación del ADN plasmídico |
| ml | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| Nav | Canales de sodio |
| °C | Grados centígrados |
| pb | Pares de bases |

| | |
|-----|---------------------------|
| RBS | Sitio de unión a ribosoma |
| rpm | Revoluciones por minuto |

| Abreviatura | Nombre completo |
|-----------------------|------------------------------------|
| SDS | Detergente dodecilsulfato de sodio |
| Tampón Fosfato salino | PBS |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| V | Voltaje |
| μl | Microlitros |
