

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.

"CARACTERIZACIÓN DEL cDNA Y EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CuZn
SUPERÓXIDO DISMUTASA Y GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE CAMARÓN
BLANCO *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*"

Por

CARMEN ARMINDA CONTRERAS VERGARA

Tesis aprobada por In

DIRECCIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para Obtener el Grado de

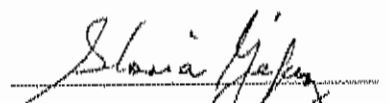
MAESTRO EN CIENCIAS

Maracaibo, Sucre,


En marzo de 2001

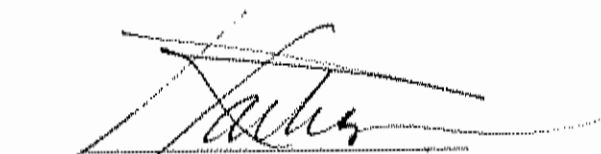
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la IB Carmen Arminda Contreras Vergara, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría de la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.


Dra. Gloria Yeliz Plascencia
Directora de Tesis


Dr. Rogerio Sotelo Mundo


Dr. Francisco Vargas Albores


Dr. Ramón Pacheco Aguilar

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C. (CIAD), Apto. Postal 1735, Hermosillo, Sonora.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

Firma



Dr. Alfonso Gardea Béjar

Director General

DEDICATORIA

A mis padres Aminda y Ramón, a quienes todo les debo, con mucho cariño.

A mis hermanos Ramón y Juan Carlos, gracias por su apoyo en todo momento.

A Juan Angel...mi esposo, compañero fiel en las buenas y en las malas.....Te amo!

A Ian David, mi manojito de ruido, por la fuerza que me ha dado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A CIAD.

A los miembros de mi comité: Dra. Gloria Yepiz, Dr. Francisco Vargas, Dr. Rogerio Sotelo y Dr. Ramón Pacheco.

Un especial agradecimiento a la Dra. Gloria Yepiz, quien ha sido para mí un gran ejemplo de trabajo y dedicación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Marina: Tere, Jorge, Flor, Angélica, Alba, Karla, Santiago, en especial al Dr. Enrique Villalpando por su gran ayuda.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos: Rogerio, Alma, Karina, Gracia, Mireya, Claudia, Sarahí, Luis Enrique, Alonso, Edgar, Enrique, Sergio, y especialmente a Gaby Romo, quien fué una excelente maestra, amiga y compañera.

A mis compañeros de generación de la Maestría.

Al CONACYT por el apoyo que me brindó como becaria para realizar mis estudios, así como al proyecto 36926 "La expresión de los genes de HDL-BGBP, SOD y Catalasa como modelo molecular de estimulación en camarón".

A Dios.....Gracias!!

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	4
ESTRÉS OXIDATIVO.....	4
<i>Radicales Libres.....</i>	<i>4</i>
<i>Especies Reactivas del Oxígeno.....</i>	<i>5</i>
<i>Daño Molecular y Celular causado por ROS.....</i>	<i>5</i>
COMPUESTOS XENOBIÓTICOS.....	6
SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES.....	7
<i>Mecanismos Antioxidantes Enzimáticos de Defensa.....</i>	<i>8</i>
SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	9
<i>CuZnSOD.....</i>	<i>10</i>
GLUTATIÓN TRANSFERASAS.....	12
<i>Modo de Acción.....</i>	<i>13</i>
<i>Clasificación de las GST's y Características Estructurales.....</i>	<i>14</i>
<i>Inducción y Resistencia.....</i>	<i>15</i>
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18

MATERIALES Y MÉTODOS	19
OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA CUZNSOD DE CAMARÓN.....	19
OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES DE UN FRAGMENTO INTERNO DE LA CUZNSOD.....	22
<i>Clonación y Transformación</i>	23
<i>Extracción de DNA Plasmídico</i>	24
<i>Análisis de Recombinantes.....</i>	25
SECUENCIACIÓN.....	26
<i>Preparación de muestras</i>	26
<i>Secuenciación y Análisis de Secuencias</i>	26
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DE CUZNSOD DE CAMARÓN	28
PREPARACIÓN DE SONDA MARCADA DE CUZNSOD PARA HIBRIDIZACIÓN	29
<i>Marcaje con Digoxigenina Utilizando Oligonucleótidos al Azar</i>	29
<i>Marcaje por PCR con los oligonucleótidos T7 y M13R</i>	31
<i>Marcaje por PCR con oligonucleótidos específicos.....</i>	32
BÚSQUEDA DEL GEN COMPLETO DE CUZNSOD EN EL BANCO DE GENES DE CDNA	33
EXCISIÓN <i>IN VIVO</i>	35
<i>Análisis de Recombinantes por Electroforesis de DNA Superenrollado</i>	36
DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	37
<i>Amplificación con Oligonucleótidos Específicos para CuZnSOD.....</i>	38
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA CUZNSOD.....	38
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA GST.....	39
DETECCIÓN DEL MRNA PARA CUZNSOD Y GST POR RT-PCR.....	39
<i>Detección de mRNA para CuZnSOD.....</i>	40
<i>Detección de mRNA para GST.....</i>	40
AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE DNA GENÓMICO CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA CUZNSOD.....	41
OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO POR OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA CUZNSOD.....	43
<i>Ligación y Transformación.....</i>	43

<i>Análisis de Recombinantes</i>	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DEL cDNA PARCIAL DE LA CUZNSOD	46
ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PARCIAL DE LA CUZNSOD.....	49
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON PARA GST A PARTIR DE UN BANCO DE GENES DE cDNA DE HEPATOPÁNCREAS.....	53
<i>Búsqueda en el banco de genes con sonda marcada de CuZnSOD</i>	53
<i>Análisis de clones</i>	55
<i>Análisis de secuencias</i>	62
ANÁLISIS DE LA SECUENCIA SIMILAR A GST	63
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA GST.....	68
DETECCIÓN DEL MENSAJE DE CUZNSOD EN DIFERENTES TEJIDOS DE CAMARÓN	68
DETECCIÓN DEL MENSAJE DE GST EN DIFERENTES TEJIDOS DE CAMARÓN.....	69
AMPLIFICACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA EL GEN COMPLETO DE CUZNSOD	70
OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES A PARTIR DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS PARA CUZNSOD.....	74
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	81
APÉNDICE	82
CLON 61	82
CLON 13.....	84
CLON 33.....	87
BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Amplificaciones con oligonucleótidos degenerados para un fragmento interno de CuZnSOD a partir de banco de genes de hepatopáncreas y DNA genómico de camarón blanco</i>	46
2	<i>Análisis de clones de CuZnSOD provenientes de amplificaciones del banco de genes de hepatopáncreas y DNA genómico, digeridos con EcoRI.</i>	47
3	<i>Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen parcial de CuZnSOD de Penaeus vannamei.</i>	49
4	<i>Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre CuZnSOD de P. vannamei y otros organismos</i>	51
5	<i>Productos de amplificación con oligonucleótidos específicos para el fragmento interno de CuZnSOD a partir de posibles clones positivos provenientes del screening del banco de genes de hepatopáncreas.</i>	55
6	<i>Amplificaciones a partir de los clones positivos, utilizando combinaciones de oligonucleótidos específicos y del vector.</i>	56
7	<i>Electroforesis en agarosa al 1.5% de DNA superenrollado de 30 clones procedentes de la excisión In vivo de 6 clones</i>	57
8	<i>Amplificaciones a partir de las colonias de 18 clones procedentes de la excisión In vivo, con oligonucleótidos SODNRv/T3</i>	59
9	<i>Digestiones con endonucleasas de restricción para el clon 6 (1.2.5)</i>	60
10	<i>Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de GST de P. vannamei</i>	63
11	<i>Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre GST de P. vannamei y otros organismos</i>	66
12	<i>Análisis electroforético de la expresión del mensaje de CuZnSOD contra una proteína constitutiva en diferentes tejidos</i>	70

Figura		Página
13	<i>Análisis electroforético de la expresión del mensaje de GST contra una proteína constitutiva en diferentes tejidos</i>	71
14	<i>Productos de amplificación utilizando 50 y 150 ng de DNA genómico de camarón blanco, azul y café con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD</i>	74
15	<i>Amplificaciones a partir de DNA genómico de camarón blanco (200ng) utilizando oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD.</i>	75
16	<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la cuantificación de las bandas de DNA amplificadas con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD</i>	76
17	<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de DNA superenrollado de los clones positivos provenientes de los productos de amplificación con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD.</i>	78
18	<i>Digestiones de los clones positivos con EcoRI para identificación de recombinantes</i>	79

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	<i>Características de los oligonucleótidos de CuZnSOD y GST utilizados en este trabajo</i>	20
2	<i>Condiciones de PCR para los diferentes programas utilizados</i>	21
3	<i>Porcentajes de homología a nivel de aminoácidos y reemplazos conservados del fragmento interno de 289 pb de CuZnSOD con secuencias homólogas de diferentes organismos, utilizando BLASTX</i>	50
4	<i>Porcentajes de homología a nivel de aminoácidos y reemplazos conservados de la secuencia obtenida de 864 pb similar a GST con secuencias homólogas de diferentes organismos, utilizando BLASTX</i>	64
5	<i>Comparación del nivel de expresión entre CuZnSOD y GST con la proteína ribosomal L21</i>	72

RESUMEN

La superóxido dismutasa (CuZnSOD) y la glutatión S-transferasa (GST) forman parte de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante en la mayoría de los organismos. La superóxido dismutasa elimina a los radicales superóxido, producto del metabolismo del oxígeno, mediante una reacción de dismutación. La glutatión S-transferasa, cataliza la conversión de un gran número de compuestos tóxicos por medio de la reducción del glutatión, a otros compuestos que fácilmente son desechados por el organismo.

Tanto la superóxido dismutasa como la glutatión S-transferasa son enzimas altamente conservadas a nivel de secuencia de aminoácidos. Ambas enzimas se han estudiado en un gran número de organismos, principalmente insectos, en donde la expresión de la GST se asocia con la resistencia a varios insecticidas. En crustáceos, la información existente acerca de estas dos enzimas hasta ahora es limitada, y en especies de importancia económica, como el camarón, su estudio cobra mayor importancia. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar a los genes de CuZnSOD y GST de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, así como detectar su expresión.

La secuencia nucleotídica de CuZnSOD se obtuvo inicialmente por medio de amplificación por PCR con oligonucleótidos degenerados para un fragmento interno de CuZnSOD, la cual se donó y secuenció para confirmar su identidad. Esta Secuencia de 289 bases, que corresponde al 62% del cDNA completo, se tradujo en 96 aminoácidos y mostró la más alta similitud con CuZnSOD de la mosca *Drosophila saltans* (66%), ciervo *Cervus elaphus* (68%) y caballo *Equus caballus* (70%), además dicha secuencia contiene a todos los aminoácidos catalíticos. Este fragmento se usó como sonda marcada para buscar el cDNA completo de CuZnSOD en un banco de genes de hepatopáncreas de camarón blanco, sin embargo no se tuvo éxito.

En cole trnbjto t:1mbk'11 se logró aislnr ,:1 d)NA c<.nnpkto de (iST de ,:n111;11-ón bl:inco. Esta s1:cuc11da de 852 pb rn11 1111 111n1\ 'ú d,i k,'ill'n continuo 1.k ü48 pb, codilka para una protdna de 21.5 n111inoi'icijhrn, que con-espollk ll una s11bu11id11d de 111 protel1rn GST co11

El peso molecular calculado de 25.1 kDa y el pI (pI) de 8.2. Esta secuencia resultó con una alta similitud al nivel de aminoácidos, con la GST tipo mu de ratón (GenBank: U00111), con una identidad del 91%, el 95% de homología, el 95% de identidad y el 95% de similitud (55%) y el 95% de similitud (55%). Se identificó también una región que es altamente conservada en este tipo de enzimas, entre los aminoácidos 58 y 67, y que corresponde al sitio G de unión al glutatión,

La expresión de CuZnSOD y GST fue detectada mediante transcripción reversa acoplada al PCR (RT-PCR), los tejidos estudiados se detectó en hepátomas, hemoctomas, músculo y bazo, no así en plópodos en ambos casos.

Este trabajo presenta la clonación y caracterización de una secuencia parcial de CuZnSOD, así como la identificación y confirmación de la secuencia completa de GST de ratón blanco. En estudios posteriores se podrá obtener completa la secuencia para CuZnSOD, además este trabajo servirá como base para estudios futuros donde se investiguen los factores involucrados en la activación y regulación del sistema antioxidante del camalón.

INTRODUCCIÓN

Aunque el oxígeno es un elemento esencial para la vida de organismos aerobios, algunos productos de su metabolismo son altamente reactivos y tóxicos. Además de éstos, existe una gran variedad de compuestos producidos sintéticamente por el hombre para mejorar la calidad de vida (tales como plaguicidas, insecticidas, etc.), muchos de los cuales, paradójicamente, han resultado ser altamente tóxicos.

Los organismos vivos han logrado mantener un equilibrio entre compuestos tóxicos y esenciales, eliminando aquellos que pueden ser dañinos, y así conservar con vida a millones de organismos. Una forma de mantener ese equilibrio, es mediante sistemas de defensa contra condiciones ambientales no favorables. Estos sistemas llegan a formar parte importante de organismos aparentemente no muy complejos, como los invertebrados (que abarcan el 97% de todos los organismos sobre la tierra) entre los que se encuentran los crustáceos.

En los últimos años se ha aumentado los estudios relacionados a los crustáceos, ya que su producción y captura forman parte importante en la economía de un gran número de países latinoamericanos, entre ellos, México. Uno de los temas que ha recibido atención especial es su sistema inmune, sin embargo existen otras formas de defensa, como el sistema enzimático antioxidante, que juega un papel muy importante en la detoxificación y buen funcionamiento de cualquier organismo. De esta forma se estudia un gran número de compuestos y proteínas relacionadas a este sistema, dentro de las que se encuentra la familia de las superóxido dismutasas y las glutatión transferasas, que aún no han sido documentadas en camarón.

ANTECEDENTES

Estrés Oxidativo

Cuando un organismo se enfrenta a condiciones ambientales adversas, entra en un estado de estrés que resulta en cambios en el programa celular, que involucra alteraciones transcripcionales importantes con el propósito de incrementar las probabilidades de sobrevivir, elevando los niveles de defensa y aplicando mecanismos de reparación (Tawe *et al.*, 1998).

En procariotes, los cambios transcripcionales que resultan de la exposición al estrés oxidativo han sido caracterizados ampliamente. Sin embargo, los mecanismos que controlan las repuestas de las células eucariotes al estrés oxidativo no han sido completamente elucidados. Se ha sugerido que en ambos existe un tipo similar de regulación, en el cual se induce a todas las enzimas con actividades de reparación y de eliminación de radicales, que actúan coordinadamente en la defensa contra el estrés (Tawe *et al.*, 1998). Esta inducción debe ser iniciada, ya sea directa o indirectamente, por radicales derivados del metabolismo del oxígeno y los daños causados por los mismos.

Radicales Libres

La teoría de los radicales libres en el envejecimiento postula una correlación entre la generación de radicales libres, las condiciones ambientales, los niveles de enzimas antioxidantes en las células y el proceso de envejecimiento (Tawe *et al.*, 1998). Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones no apareados; es decir, que se encuentra solo en un orbital capaz de existir independiente (de aquí el

término “libre”) (Stryer, 1995). Los radicales libres y otras especies derivadas del oxígeno son constantemente generadas *in vivo*, tanto por reacciones químicas “accidentales” como para propósitos metabólicos específicos. La reactividad de los diferentes radicales libres varía, pero algunos causan daños severos a moléculas biológicas, especialmente al DNA, lípidos y proteínas. Aunque existen sistemas antioxidantes que depuran y minimizan la formación de especies reactivas del oxígeno, estos no son 100% efectivos (Mathews & Van Holde, 1983).

Especies Reactivas del Oxígeno

El oxígeno es un elemento esencial para la vida. En su configuración normal (O_2) el oxígeno es relativamente poco reactivo. Sin embargo, durante el metabolismo normal y debido a perturbaciones ambientales y contaminantes, el oxígeno da origen a diversos intermediarios altamente tóxicos o letales.

Estos intermediarios llamados especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species o ROS), incluyen tanto radicales del oxígeno como compuestos no radicales, pero inestables. De acuerdo al orden en que se producen a partir de la reducción del O_2 , éstos son: el radical superóxido ($\bullet O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Dempfle, 1991). Uno de los radicales más reactivos es el hidroxilo, ya que reacciona con casi todas las moléculas en las células. También puede ser producto de la fisión del enlace O-H del agua causada por la exposición a radiación gamma (Stryer, 1995).

Daño Molecular y Celular causado por ROS

Las principales moléculas biológicas de todos los organismos pueden ser dañadas por estos derivados del oxígeno. Algunas de las consecuencias del daño oxidativo son: la peroxidación de lípidos de membranas que puede llegar a ocasionar lisis celular; la

oxidación de aminoácidos, que en el caso de las metaloenzimas puede ocasionar inactivación enzimática, lo cual contribuye al envejecimiento celular; y, principalmente, las mutaciones causadas en el DNA (Mathews & Van Holde, 1983; Hunter *et al.*, 1997; Demple, 1997). Los radicales hidroxilo causan rompimiento de las cadenas de DNA, que no se pueden reparar cuando el rompimiento es de una doble cadena, lo cual interrumpe la replicación del cromosoma y la célula muere (Mathews & Van Holde, 1983).

Si este daño continúa o permanece sin reparación, la integridad y función celular podrían comprometerse rápidamente. La eliminación rápida y efectiva de estas especies de oxígeno es esencial para la sobrevivencia y correcta función de todos los organismos vivientes.

Compuestos Xenobióticos

Todos los organismos están expuestos, de manera normal, a compuestos químicos externos sin valor nutritivo que son ingeridos, inhalados o absorbidos por el organismo ocasionando daños. Este tipo de compuestos, llamados xenobióticos, son principalmente consecuencia de la industrialización, debido a que el hombre, en su afán de hacer más cómoda la vida, ha producido materiales que son tan útiles como peligrosos en la vida diaria (Jakoby & Ziegler, 1990). Tal es el caso de pesticidas, plaguicidas, insecticidas y un gran número de compuestos orgánicos sintéticos.

Sin embargo, no sólo el hombre produce estas toxinas, sino también diversas especies de plantas y animales las producen de manera natural, lo cual puede considerarse como una exitosa adaptación evolutiva contra los predadores. Muchos microorganismos, particularmente bacterias, tienen la capacidad de metabolizar y utilizar la mayoría de los productos de la industria química debido a su gran número, su corto tiempo de generación y a su capacidad para intercambiar material genético (Jakoby & Ziegler, 1990).

En los animales, a diferencia de las bacterias, existen sistemas adaptados para la eliminación de compuestos tóxicos. Como la mayoría de los compuestos xenobióticos son lipofílicos y pueden acumularse hasta niveles tóxicos, es necesario que al menos sean metabolizados hasta productos solubles en agua que puedan ser fácilmente excretados por el organismo (Denison & Whitlock, 1995).

Sistemas de defensa antioxidantes

Para enfrentarnos a los retos ocasionados por compuestos dañinos, todos los organismos estamos provistos de sistemas de defensa, que incluyen la eliminación tanto de radicales libres como de compuestos xenobióticos.

Existen dos tipos de defensas antioxidantes. Los mecanismos no enzimáticos incluyen a un gran número de compuestos que sirven como antioxidantes biológicos, que actúan eliminando radicales del oxígeno o en la reducción química de compuestos oxidados. Entre ellos se encuentran el β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol (vitamina E), flavonoides, hidroxiquinonas y glutatión (Stryer, 1995). Las defensas enzimáticas incluyen enzimas que son capaces de remover, neutralizar o depurar los radicales libres e intermediarios del oxígeno. Como los principales componentes del sistema antioxidante enzimático se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa (Mourente & Díaz-Salvago, 1999).

Para la eliminación de compuestos tóxicos, o xenobióticos, existe un grupo de aproximadamente 30 enzimas, llamadas "enzimas de detoxificación" (Jakoby & Ziegler, 1990), en donde se incluye a la glutatión transferasa y glutatión peroxidasa, así como a las monooxigenasas de los citocromos P-450. Estas últimas actúan sobre un gran número de compuestos xenobióticos, y por lo general catalizan el paso inicial en los procesos de detoxificación (Denison & Whitlock, 1995).

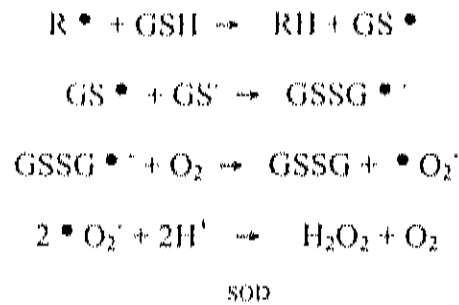
Mecanismos Antioxidantes Enzimáticos de Defensa

Dentro de los mecanismos enzimáticos de defensa, se mencionaron anteriormente la glutatión reductasa (GR), que elimina el peróxido de hidrógeno en cloroplastos y mitocondrias; la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), que remueven el peróxido de hidrógeno de las células; y la superóxido dismutasa (SOD), que depura los radicales superóxido (Hwang *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1993).

La CAT y la SOD son las enzimas más eficientes de los mecanismos enzimáticos de defensa, ya que éstas al combinarse pueden convertir los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Sin embargo, un balance entre las diferentes enzimas antioxidantes determina los efectos patológicos y fisiológicos de las especies oxidantes, así como su eliminación (Amstad *et al.*, 1991; Hernández-Saavedra, 1997). Una suposición frecuente es que cualquier aumento significativo en la actividad de SOD debe estar acompañado de un incremento comparable en la actividad de CAT y/o GPx para prevenir la excesiva acumulación de peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, tanto la GR como la GPx y la glutatión transferasa (GST) actúan utilizando al glutatión en los procesos de detoxificación. La GPx cataliza la reacción entre el glutatión (GSH) y el peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos, donde el glutatión se oxida (GSSG). Este último vuelve a su forma reducida (GSH) por medio de la GR, de tal manera que se conserva la relación GSH / GSSG mayor a 500 que existe en la mayoría de las células y que es esencial para mantener la estructura normal de los eritrocitos (Mathews & Van Holde, 1983). La GST cataliza la adición de radicales de diferentes tipos, procedentes de ROS u otros compuestos tóxicos (xenobióticos) al glutatión, para su posterior eliminación.

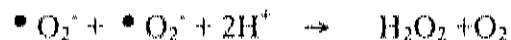
El GSH también actúa en conjunto con la SOD en la prevención del daño oxidativo, mediante la siguiente reacción (donde R^\bullet es un radical con centro de carbono) (Dickinson & Forman, 2002):



La SOD es la barrera más importante para la eliminación de los radicales superóxido, que son los primeros en formarse y son responsables de la formación de otros radicales más peligrosos, y que es el tema de este trabajo, así como la enzima GST que también actúa en la eliminación de este tipo de compuestos. Estas enzimas se describen más adelante.

Superóxido Dismutasa

Las superóxido dismutasas (EC 1.15.1.1), son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación, reacción en la cual dos moléculas de sustrato idénticas tienen diferentes destinos. En la reacción, una molécula de superóxido es oxidada y la otra es reducida (Mathews & Van Holde, 1983):



Las SOD's se encuentran en todos los organismos aerobios (Banks *et al.*, 1995; Rhie *et al.*, 1999) y se han clasificado en tres grupos, de acuerdo al metal que contienen: FeSOD que se encuentra en organelos y espacio periplásmico de procariotes y en plantas, MnSOD que se encuentra en el citosol de procariotes y en la mitocondria de eucariotes y la CuZnSOD que se encuentra en el citoplasma celular (SOD citosólica) y compartimentos extracelulares en eucariotes (SOD extracelular), así como en el periplasma de bacterias Gram-negativas (Brouwer *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1999). En los últimos años se han descrito otras formas de SOD poco comunes; NiSOD en organismos

del género *Streptomyces*, FeMnSOD en organismos del género *Streptococcus*, y FeZnSOD en ambos géneros (Hernández-Saavedra & Romero-Geraldo, 2001).

Aunque la SOD ha sido estudiada en organismos aerobios, se ha encontrado que en algunos organismos anaerobios juega un papel importante en la detoxificación de subproductos del oxígeno, tal es el caso de algunas bacterias reductoras de sulfato como *Desulfomicrobium norvegicum*, *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio gigas*, en donde se ha identificado a una FeSOD dimérica con subunidades de 22 kDa (Dos Santos *et al.*, 2000).

La MnSOD de organismos superiores que se encuentra en la matriz de la mitocondria, está compuesta de cuatro subunidades idénticas de 24 kDa (Brouwer *et al.*, 1997). Un precursor de esta enzima de mayor tamaño es producido en el citosol y transportado hacia la mitocondria. Esta es una enzima altamente inducible que responde a una variedad de estímulos, incluyendo endotoxinas bacterianas, interleucinas, ésteres de forbol y peróxido de hidrógeno. Las secuencias de aminoácidos de todas las MnSODs, ya sea de animales, plantas o bacterias, son extremadamente similares entre sí y no se relacionan con las de CuZnSODs (Brouwer *et al.*, 1997).

Aunque estas enzimas (CuZnSOD y MnSOD) catalizan la misma reacción, la MnSOD es estructuralmente distinta de la CuZnSOD y cada una es codificada por un gene diferente. El gene de la MnSOD ha sido clonado y caracterizado de varias especies de bacterias y levaduras. Además se han aislado cDNAs de MnSOD del hombre, rata, maíz y otras plantas. La gran homología de la MnSOD a nivel de aminoácidos entre organismos tan distantes filogenéticamente sugiere que es una enzima altamente conservada en el reino biológico (Miao & Gaynor, 1993).

CuZnSOD

Las CuZnSOD's son proteínas diméricas, compuestas de dos subunidades idénticas de alrededor de 155 aminoácidos, con una masa molecular de 16 kDa cada una, y a cada

subunidad se une un átomo de cobre y un átomo de zinc. Las dos subunidades que conforman a la enzima, no son glicosiladas y se mantienen unidas entre sí por interacciones hidrofóbicas. Las formas de SOD extracelular se ha propuesto que son proteínas tetraméricas, glicosiladas a través de una unión N y tienen una secuencia señal de 18 aminoácidos (Hjalmarsson *et al.*, 1994).

Las secuencias de aminoácidos de las CuZnSODs de varios hongos, plantas, nemátodos, insectos, anfibios, peces y mamíferos son muy similares, pero aquellas para CuZnSODs extracelulares de mamíferos y las CuZnSODs del periplasma bacteriano, se diferencian ampliamente entre ellas (Brouwer *et al.*, 1997).

El sitio activo de la enzima citosólica en eucariotes está formado por residuos de histidina que coordinan a los iones de cobre y zinc. De acuerdo a la estructura de esta enzima de bovino, el cobre es coordinado por 4 residuos de histidinas (posiciones 44, 46, 61 y 118 en la secuencia de aminoácidos) y el zinc está unido al cobre por medio de la His 61 y también interactúa con las His 69, 78 y el Asp 81 (Hernández-Saavedra & Romero Geraldo, 2001). Estudios de mutación dirigida han mostrado que las histidinas que coordinan a los iones metálicos, pueden ser reemplazadas por otros aminoácidos sin que se pierda su estructura (Lu *et al.*, 1996).

El mecanismo de oxido-reducción que realiza esta enzima es el siguiente: El ion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) negativamente cargado es guiado electrostáticamente a un sitio catalítico cargado muy positivamente, se une al Cu^{+2} y al grupo guanidinio de un residuo de arginina, llevando a la transferencia de un electrón del radical superóxido al ion cúprico para formar Cu^+ y O_2 , un segundo radical superóxido entra al sitio activo y se une al Cu^+ , a la arginina y al H_3O^+ . El enlace del $\bullet\text{O}_2$ adquiere un electrón del Cu^+ y dos protones de la arginina y el H_3O^+ , para formar H_2O_2 y regenerar el Cu^{+2} (Mathews & Van Holde, 1983). Mientras que el átomo de cobre es el que sufre la óxido-reducción, el átomo de zinc contribuye solamente al mantenimiento de la configuración y estructura del sitio activo.

Hasta ahora, se encuentran reportadas secuencias de genes para los diferentes tipos de SOD de un gran número de especies, en su mayoría vertebrados e insectos. En invertebrados, específicamente en crustáceos, se ha detectado la CuZnSOD en los cangrejos *Aristeus antennatus* (Mourente & Diaz-Salvago, 1999) y *Carcinus maenas* (Bell y Smith, 1994); en *Macrobrachium rosenbergii* (Dandapat *et al.*, 2000) y sólo en el langostino *Pacifastacus leniusculus* (Johansson *et al.*, 1999) se ha reportado su secuencia nucleotídica.

La CuZnSOD también se ha estudiado por su función en el sistema inmune de invertebrados (Seto *et al.*, 1989; Shin *et al.*, 1998; Johansson, 1999; Holmblad y Soderhall, 1999), en donde la forma extracelular de esta enzima actúa como parte de un grupo de proteínas de la hemolinfa, que reconocen y se unen al organismo extraño y lo eliminan durante el proceso de fagocitosis, por la producción de compuestos tóxicos. En crustáceos esta función de la CuZnSOD se ha documentado en el langostino *Pacifastacus leniusculus* (Johansson *et al.*, 1999), y la producción de superóxido *in vitro* ha sido reportada en las células hialinas del cangrejo *Carcinus maenas* (Bell & Smith, 1994). En *Penaeus vannamei* (Campa-Córdova *et al.*, 2002) han reportado la actividad de esta enzima en respuesta a un reto inmunológico, sin embargo hasta ahora se desconocen los detalles moleculares relacionados con su secuencia.

Glutación Transferasas

Las glutatión transferasas o GST's (EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas detoxificantes que catalizan la conjugación del glutatión (GSH) con una gran variedad de electrófilos, así como la reducción de oxidantes por el GSH. Se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos, donde su papel principal es el mantenimiento de la integridad celular. Las formas más conocidas de las GST's son citosólicas, sin embargo también se ha encontrado una GST microsomal que se encuentra unida a la membrana celular (Sun & Morgenstern, 1997; Jakobsson *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que las GST's están involucradas en la detoxificación de un gran número de xenobióticos, en los que se incluye el paraquat, 3-metil clorantreno y plumbagin. Los hidroperóxidos de los lípidos, que son productos de la peroxidación debida al ataque de los radicales libres a las membranas, también son sustratos para estas enzimas (Tawe *et al.*, 1998).

Modo de Acción

El glutatión es un tripéptido llamado también γ -glutamileisteinilglicina, debido a los aminoácidos que lo componen. Se encuentra de manera abundante en las células (~5 mM), a las que protege manteniendo un ambiente reductor intracelular, lo cual previene la oxidación a disulfuros de los grupos tiol de las proteínas (Stryer, 1995). También, a través de la acción de las GST's, participa en la detoxificación de muchas sustancias, como los xenobióticos, o electrófilos producidos por la acción de las oxidasas asociadas al citocromo P-450. Tales compuestos incluyen haluros orgánicos, peróxidos de ácidos grasos derivados de la oxidación de lípidos, y productos ocasionados por DNA dañado por radiación (Stryer, 1995).

La forma en la que el glutatión reacciona con tales compuestos se ha estudiado en mamíferos, y se ha descrito de la siguiente manera: El glutatión reacciona con un compuesto (RX), donde R puede ser un grupo alifático, aromático o heterocéflico y X puede ser un grupo sulfato, nitrato o un haluro. Mediante la acción de las GST's, se transfiere el radical (R) hacia la cisteína del glutatión. Enseguida hay un rompimiento de los residuos γ -glutamil y glicil, y una acetilación por la acetil-CoA para producir finalmente ácido mercaptúrico, que es más soluble y un derivado menos tóxico que el compuesto original y entonces puede ser excretado en la orina (Stryer, 1995).

Clasificación de las GST's y Características Estructurales

A las GST's (EC 2.5.1.18) también se les ha llamado Glutación S-alquiltransferasa, Glutación S-ariltransferasa, S-(hidroxialquil)glutación liasa y Glutación S-aralquiltransferasa; de acuerdo al radical que transfieran al glutatión (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicezyme.pl?2.5.1.18>).

Las GST's de eucariotes primero fueron divididas en las clases alfa, mu y pi, en base a las distintas especificidades por sustratos modelos (como el 1-cloro-2-4-dinitrobencono o DCNB). Posteriormente el descubrimiento de GST's con propiedades diferentes a las de las clases ya definidas, dio origen a la clase teta (Vuilleumier, 1997), y más recientemente a las clases kappa y zeta (Ketterman *et al.*, 2001).

Esta clasificación se confirmó cuando se tuvieron datos disponibles acerca de las secuencias aminoacídicas, con similitudes del 50-90% dentro de una misma clase, y alrededor de 30% entre clases diferentes (Vuilleumier, 1997; Ketterman *et al.*; 2001). Otras clases incluyen la sigma, en cefalópodos y artrópodos, la phi en plantas y la delta en insectos, la cual anteriormente era referida como teta (Ketterman, 2001). En insectos las GST's se clasifican en clase I y clase II de acuerdo a su inmunoreactividad cruzada y su secuencia aminoacídica (Ranson *et al.*, 1997).

La versatilidad funcional y la variabilidad de las secuencias de las GST's, puede entenderse en base a la conservación de esquemas estructurales observados a través de las diferentes clases de GST's. En general, las GST's tienen una estructura homodimérica, en donde cada monómero (de alrededor de 220 aminoácidos y 25 kDa) está compuesto de dos dominios: el dominio N-terminal, donde se encuentra el sitio de unión al glutatión (sitio G) y consiste en un módulo $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, y un dominio C-terminal, predominantemente α -hélice, que se relaciona con la unión a sustratos hidrofóbicos de una manera más inespecífica. El análisis mediante alineamientos múltiples para las GST's de las clases alfa, mu y pi, indican que la mayoría de los residuos que son altamente conservados entre ellas, no son los mismos que para las GST's bacterianas y de la clase teta (Vuilleumier, 1997).

Las secuencias de aminoácidos para GST's de la clase mu, están compuestas predominantemente de residuos hidrofílicos, característicos de las GST citosólicas, en donde se ha comprobado que los residuos de cisteínas no son esenciales para la actividad catalítica de las GST's de la clase mu (Rosa de Lima *et al.*, 2002).

Inducción y Resistencia

Las GST's son enzimas citosólicas que provienen de una familia de multigenes que pueden ser expresadas constitutivamente o ser inducidas por un gran número de compuestos, tanto de origen natural como xenobióticos (Vuilleumier, 1997). Además son diferencialmente reguladas, expresándose enzimas diferentes en diferentes tejidos, durante cada estado de desarrollo y en respuesta a varios xenobióticos (Ranson *et al.*, 1997). Dentro de estos xenobióticos se encuentran compuestos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, antioxidantes fenólicos, especies reactivas del oxígeno, isotiocianatos, arsénicos trivalentes, barbituratos y glucocorticoides (Eaton & Bammler, 1999).

Las GST's están implicadas en el desarrollo de la resistencia de un gran número de organismos a drogas, pesticidas, herbicidas y antibióticos. Un incremento en los niveles de expresión de GST se ha correlacionado con la resistencia a los insecticidas, como el DDT utilizado en el control de la malaria que ha propiciado especies resistentes del mosquito *Anopheles* (Ranson *et al.*, 1997), y principalmente a compuestos organofosforados en varios insectos (Kostaropoulos *et al.*, 2001; Rosa de Lima *et al.*, 2002).

Algunos tipos de GST's tienen una alta especificidad catalítica por epóxidos carcinógenos y pesticidas, de tal manera que la ausencia, presencia o modulación de estas isoenzimas, puede afectar marcadamente la susceptibilidad de especies particulares a algunos tóxicos químicos (Henson *et al.*, 2000). La expresión de estas GST's también es regulada por sus sustratos, como es el caso del compuesto 4-hidroxinonenal (4HNE) que es un producto de la peroxidación de lípidos y causante del daño producido por

ROS, el cual es removido de las células por medio de la acción del GSH catalizada por las GST's que tienen especificidad por los alquenos (Dickinson & Forman, 2002).

El Cypermethrin es un piretroide sintético que es particularmente tóxico en crustáceos y que ha mostrado que induce la actividad de GST en el salmón *Onchorhynchus mykiss*, en cuyo cultivo se utiliza para el control de infestaciones por piojos marinos. Por lo anterior se ha estudiado la actividad de GST como un biomarcador de la exposición a este tipo de tóxicos en crustáceos como el cangrejo *Carcinus maenas* (Gowland *et al.*, 2002) y en *Mytilus edulis* (Astley, 1999).

JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (camarón blanco del occidente) es uno de los crustáceos marinos más importantes debido a su alta demanda y a que es muy adecuado para el cultivo. Esto es debido a que soporta altas densidades de poblaciones en estanques y sus requerimientos proteínicos son menores que los de otras especies (Ocean Garden, 1991). Sin embargo, como el resto de los organismos, el encontrarse en condiciones ambientales no favorables, tales como hipoxia o la exposición a compuestos xenobióticos, provoca un estrés oxidativo que genera compuestos tóxicos adicionales a los producidos durante el metabolismo normal (Dandapat *et al.*, 2000).

Los sistemas de defensa antioxidante realizan una función muy importante, ya que protegen del estrés oxidativo a todos los organismos. Entre estos sistemas enzimáticos, se encuentra la Superóxido Dismutasa (SOD), que ha sido ampliamente estudiada en invertebrados (Banks *et al.*, 1995; Brouwer *et al.*, 1998; Holmblad & Soderhall, 1999; Strohmeier & Inlay, 1998). La mayoría de los estudios se ha enfocado a insectos, en donde la resistencia a ciertos compuestos xenobióticos es mediada por la inducción de enzimas tales como la Glutación S-Transferasa (GST). Sin embargo hasta ahora, en crustáceos esta información es escasa.

Por el importante papel que realizan estas enzimas antioxidantes en los sistemas de defensa de invertebrados y la importancia que el conocimiento sobre el camarón ha adquirido por el éxito en su cultivo, es necesario realizar estudios sobre estas enzimas, específicamente en especies importantes para la camaronicultura. Por lo anterior, en este trabajo se propone estudiar los genes que codifican para las enzimas SOD y GST del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener y caracterizar a los genes de las enzimas antioxidantes CuZnSOD y GST de camarón blanco *Penaeus. vannamei* y detectar su expresión en diferentes tejidos.

Objetivos Específicos

1. Amplificar por PCR una secuencia parcial de CuZnSOD.
2. Clonar y obtener la secuencia del gen de CuZnSOD.
3. Aislar y secuenciar el cDNA de GST a partir de un banco de genes de *P. vannamei*.
4. Detectar el mRNA de CuZnSOD y GST por medio de RT-PCR en tejidos de camarón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Productos de PCR con Oligonucleótidos Degenerados para CuZnSOD de camarón

Se inició a partir de dos muestras de DNA provenientes de hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Una de ellas proveniente de un banco de genes de cDNA construido a partir del mRNA (*a*) y la otra a partir de DNA genómico (*b*). La construcción del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas se ha descrito en Tavares-Sánchez, (2001); y la extracción de DNA genómico en Felipe-Ortega, (2000).

Ambas muestras se amplificaron con los oligonucleótidos degenerados SODFw (sentido) y SODRv (antisentido), utilizando la enzima *Taq* polimerasa (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Estos oligonucleótidos fueron diseñados, anteriormente a este trabajo por la Dra. Carolina Barillas-Mury de la Universidad Estatal de Colorado, a partir de secuencias internas conservadas de la CuZnSOD de *Drosophila melanogaster* (número de acceso GenBank P00444), considerándose las secuencias aminoácidas HGFHVHEFG que se encuentra en las posiciones 11 a 19 para el oligonucleótido sentido (SODFw) y DDLGQGGHE para el antisentido (SODRv) ubicado en los aminoácidos 23 al 31 (Tabla 1).

Las condiciones de amplificación en el termociclador (Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA) fueron las del Programa 2 (Tabla 2). Las reacciones de PCR contenían 2.5 µl de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3), 3.75 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTPs (2.5 mM c/u), 2 µl de oligonucleótido SODFw 20 µM, 1 µl de oligonucleótido SODRv 20 µM, 2 µl de polimerasa *K-Taq* (obtenida en el Laboratorio de Biotecnología Marina, CIAD, A.C.). Los productos de PCR obtenidos (SOD*a* y SOD*b*) se sometieron a electroforesis en gel

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos de CuZnSOD y GST utilizados en este trabajo

Nombre	Tm	%GC	Secuencia de nucleótidos
SODFw	-	-	CAYGGITTYCAYGTICAYGARTTYGG
SODRv	-	-	YTCRTGRTCICCYTGICCIARRTCRTC
SODNRv	76.7	61.9	TGGTCGCCTTGGCCGAAATCG
SODNFw	73.0	54.55	TGGGTTC CACGTGCACGAATC
CuSOD1Fw	80.0	53.57	TGCATGTCAACAGGCGCCCACTTCAATC
CuSOD1Rv	75.9	50.0	CGACGTTCAA AACTCCGCTTAGGGCAAT
CuZnSODFw3	62.0	34.78	ATGGTIGTIAARGCIGTITGYGT
CuZnSODRv3	56.2	30.43	ATYTTIGCIATICCIATACICC
GSTFw	66.9	52.17	CCAGACTACGACAAGAGCGAATG
GSTRv	66.7	56.52	GTAGGCCAGGAAGTCGATGTAGG

I: Inosina, Y: T+C, R: A+G

Tabla 2. Condiciones de PCR para los diferentes programas utilizados

Programa 1	Programa 2	Programa 3	Programa 4
1 ciclo 94°C 1min 60°C 1min 72°C 3 min	1 ciclo 94°C 3 min 55°C 1 min 72°C 3 min	1 ciclo 94°C 3 min 55°C 1 min 72°C 3 min	1 ciclo 94°C 3 min 60°C 1 min 72°C 1 min
1 ciclo 94°C 1min 52°C 1min 72°C 3 min	1 ciclo 94°C 1 min 42°C 1 min 72°C 3 min	34 ciclos 94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 3 min	35 ciclos 94°C 1 min 65°C 1 min 72°C 1 min
32 ciclos 94°C 1 min 55°C 1min 72°C 2 min	33 ciclos 94°C 1 min 52°C 1 min 72°C 3 min	1 ciclo 72°C 10 min 4°C final	1 ciclo 72°C 10 min 4°C final
1 ciclo 72°C 10 min 4°C final	1 ciclo 72°C 10 min 4°C final		

de agarosa (1.5%), utilizando 15 μ l de producto de PCR con 2.5 μ l de buffer carga 6X (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de Xylene Cyanol FF y Glicerol al 30% en agua) (Sambrook, 1989).

La electroforesis se realizó a 75 V usando buffer TAE 1X (50X: 242 g Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0, en un litro) hasta que el colorante azul de bromofenol avanzó un 75% en el gel. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 2 min, luego se destiñó en agua destilada por 5 min. Para observar la presencia de bandas se utilizó un transiluminador de luz U.V. (modelo TFX-35M, Gibco, BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, EUA) a 312 nm. Enseguida se tomó una fotografía del gel con una cámara digital Kodak DC 120 (Rochester NY, EUA) y se procesó mediante el programa *ID Image Analysis Software* del sistema de fotodocumentación Kodak Digital Science (Rochester NY, EUA). Se utilizó un estándar para DNA (166 ng/ μ l) 1 Kb ladder (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 y 75 pb; Gibco, BRL, Gaithersburg MD, EUA) para las comparaciones.

Las bandas correspondientes al producto de PCR y con tamaño esperado de ~300 pb, fueron purificadas, para su posterior clonación, partir del gel de agarosa de acuerdo al protocolo del kit comercial Gene Clean II (BIO 101 Inc, La Jolla CA, EUA). Este método se basa en la unión del DNA (fragmentos mayores a 100 pb) a una matriz de silica, a la que no se unen oligonucleótidos, RNA pequeños y proteínas, que son eliminados por medio de lavados. El DNA, ya aislado de los contaminantes anteriores, se obtiene por elución de la matriz con soluciones de baja fuerza iónica o agua.

Obtención de Recombinantes de un Fragmento Interno de la CuZnSOD

La clonación de los productos de PCR amplificados se realizó mediante el sistema TOPO-TA Cloning kit (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA) en el cual se utiliza como vector al plásmido pCR 2.1 TOPO (3.9 kb) e incluye una topoisomerasa. Este vector tiene las

características de tener en el extremo 3' una deoxitimidina saliente que se une al fragmento de PCR, el cual debe tener una A adicional en sus extremos, permitiendo que se lleve a cabo la clonación mediante la ligación del fragmento de PCR por medio de la acción de la topoisomerasa I. Con este DNA ya ligado se transforman células *de Escherichia coli* competentes que se pueden obtener por tratamiento químico o electroporación.

Para asegurar que el producto de PCR esté provisto de esta A adicional en el extremo 3', se realizó una adición de esta adenina ("refreshing"). A 4 µl de cada muestra se agregó 10 µl de una mezcla para PCR comercial (PCR Supermix, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), la cual contiene *Taq* DNA polimerasa y todos los componentes necesarios para hacer PCR. Estas mezclas se incubaron en el termociclador con las siguientes condiciones: Pre calentamiento a 105°C, calentamiento a 72°C por 10 min y luego se mantuvo a 4°C.

Clonación y Transformación

Primeramente se realizó una reacción de ligación, mezclando 4 µl del DNA (~15 ng) con la A adicionada, 1 µl de solución salina (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M), 1 µl del vector TOPO TA (10 ng/µl) y se agregó agua estéril hasta completar un volumen final de 5 µl. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La transformación se realizó en células de *E. coli* TOP 10 F' One Shot[®] químicamente competentes (50 µl) a las cuales se agregó 2 µl de la reacción de ligación anterior, se mezclaron perfectamente y se incubaron en hielo durante 30 min. Enseguida se aplicó un choque térmico colocando la mezcla a 42°C por 30 segundos sin agitar y de nuevo se colocó en hielo durante 2 min. Se agregaron 250 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó colocando el vial donde estaba la mezcla en forma horizontal con agitación a 200 rpm y 37°C por 1 h en un agitador Lab-line modelo 3527 (Lab-line, Melrose Park, IL, EUA).

Las células transformadas se sembraron esparciendo volúmenes de 50, 100 y 150 μ l sobre placas de agar LB (NaCl 1.0%, Triptona 1.0%, extracto de levadura 0.5% y 1.5% de agar, pH 7.0) (Sambrook *et al.*, 1989) con ampicilina (50 μ g/ml), impregnadas en su superficie con 40 μ l de IPTG (100 mM) y X-gal (40 mg/ml) para la detección de clones recombinantes por medio del sistema β -galactosidasa. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La inserción del fragmento de DNA en el sitio múltiple de clonación del vector, interrumpe el gen de la β -galactosidasa y origina el desarrollo de colonias blancas, que son las células recombinantes o transformadas. Las colonias azules son el resultado de la expresión de la β -galactosidasa en presencia de IPTG (Isopropil- β -tiogalactopiranosido), que es inductor del promotor del gen *lac*, y el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (Felipe-Ortega, 2000), en las cuales no se llevó a cabo la inserción, es decir, no se transformaron.

Extracción de DNA Plasmídico

Los clones potenciales positivos, aquellos que se observaron como colonias blancas, posteriormente se sembraron en 5 ml de caldo LB con ampicilina (50 μ g/ml) y en agar LB con ampicilina (50 μ g/ml) como réplica, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los cultivos en caldo se incubaron con agitación a 250 rpm (agitador Lab-line modelo 3527, Melrose Park, IL, EUA). A partir de estos posibles positivos se aisló el DNA plasmídico por medio del protocolo para aislamiento rápido de DNA plasmídico por lisis alcalina "Mini Preps" (Sambrook *et al.*, 1989), modificado por Yepiz-Plascencia, 2000.

Los cultivos en caldo se centrifugaron en un microtubo (1.5 ml de cada cultivo) a 10,000 \times g por 10 min y a temperatura ambiente, para obtener un pellet bacteriano. Estas células pelletizadas se resuspendieron en 250 μ l de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM) y se agregaron 250 μ l de solución II recién preparada (solución de lisis: NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron bien y se dejaron a temperatura ambiente por 10 min. Después se agregaron 250 μ l de solución III fría (60 % de acetato

de potasio 5 M, 11.5 % de ácido acético glacial, 28.5 % de agua a 4°C) se mezclaron y se incubaron en hielo por 15 min.

Las muestras se centrifugaron a 13,000 \times g por 10 min, se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se les agregó 500 μ l de isopropanol a temperatura ambiente. Se volvieron a centrifugar a 13,000 \times g por 30 min a temperatura ambiente, se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron los pellets con 300 μ l de etanol al 70% frío centrifugando por 5 min. Se removió el etanol y las muestras precipitadas de esta forma, se secaron al vacío por 10 min en un concentrador (SpeedVac Savant AES2010, Holbrook, NY, EUA). Finalmente se resuspendió el pellet seco en 50 μ l de agua estéril y se añadió RNasa A (10 mg/ml).

Análisis de Recombinantes

Para analizar los clones recombinantes, se liberó el fragmento insertado en el vector mediante la utilización de una enzima de restricción. Se utilizó la enzima *EcoRI* (Gibco BRL, Gaithersburg MD, EUA) ya que ésta reconoce dos sitios internos en el sitio múltiple de clonación del vector TOPO 2.1, los cuales son adyacentes al sitio de inserción del fragmento clonado, permitiendo la liberación del inserto.

Las digestiones se realizaron con la enzima *EcoRI*, utilizando 3 μ l de las preparaciones de plásmido, 0.5 μ l de la enzima *EcoRI* (1 μ l =10 U que digiere 10 μ g de DNA), 1.5 μ l de Buffer 10X para la enzima y 10 μ l de agua estéril para tener un volumen final de 15 μ l. Se incubaron en un baño de agua (Precision Water Bath, Precision Scientific, Chicago IL, EUA) a 37°C por 1.5 h y se analizaron los fragmentos obtenidos por la digestión en un gel de agarosa al 1.5%, donde se cargaron 15 μ l de muestra digerida con 2.5 μ l de buffer carga 6X para DNA. Los productos de la digestión se detectaron por tinción con bromuro de etidio, exposición a luz UV y se tomó la fotografía como anteriormente se describió.

Secuenciación

Preparación de muestras

Al identificar recombinantes que mostraron bandas del tamaño esperado para el fragmento de CuZnSOD, se prepararon las muestras para la determinación de su secuencia nucleotídica. Las muestras de DNA plasmídico (~40 μ l) se llevaron con agua estéril a un volumen de 100 μ l, se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) equilibrado con Tris 10 mM pH 8.0, se mezclaron en vortex y se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf 5415- D (Eppendorf, Hamburg Alemania) a 13,000 \times g por 5 min a temperatura ambiente.

La fase acuosa se recuperó y se realizó el mismo procedimiento. Se realizó otra extracción más, pero ahora con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y al sobrenadante acuoso se le agregó la $\frac{1}{2}$ de volumen de acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se incubaron a -70°C por media hora y se centrifugaron a 13,000 \times g por otra media hora (a 4°C). Los pellets se lavaron con etanol al 70% frío, se secaron al vacío en SpeedVac y se resuspendieron en 20 μ l de agua estéril. La concentración y pureza del DNA plasmídico obtenido de cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, y se utilizó la relación $A_{260/280}$ como indicador de pureza (Sambrook *et al.*, 1989).

Secuenciación y Análisis de Secuencias

La secuenciación se realizó en el LMSE (Laboratory of Molecular and Systematic Evolution) de la Universidad de Arizona, en un secuenciador automático 2ABI 337, basado en el método de terminación de cadena con dideoxidos (Sanger *et al.*, 1997), a donde se enviaron las muestras conteniendo aproximadamente 0.5 μ g/ μ l de DNA plasmídico. Para un fragmento interno de CuZnSOD se realizó una segunda secuenciación en el Laboratorio de Biotecnología Marina (CIAD, A. C.), utilizando un

secuenciador automático ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), usando el mismo método enzimático pero con marcaje fluorescente con el colorante Cy5. Para este procedimiento se usó el sistema Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

De acuerdo a este sistema, se preparó una mezcla de dNTP /Cy5 ddNTP para cada uno de los cuatro nucleótidos (A, C, G y T), añadiendo los siguientes componentes de forma separada para cada nucleótido: 0.4 μ l de dNTP 1.1 mM, 0.2 μ l de dideoxidos marcados fluorescentemente (Cy5 ddNTPs: ddATP 8.8 μ M, ddCTP 7.0 μ M, ddGTP 17.6 μ M y ddTTP 114.3 μ M) y 1.6 μ l de agua destilada estéril por cada reacción de secuenciación, es decir para cada nucleótido.

Para cada grupo de 4 reacciones (A, C, G y T) se preparó una mezcla con el DNA molde (1.0-20.5 μ l de DNA, se recomienda de 1 a 2 μ g de plásmido), 2 μ l de oligonucleótido T7 (4 pmol), 3.5 μ l de buffer de reacción (Tris-HCl 150 mM, pH 9.5; MgCl₂ 35 mM), 1 μ l de DNA polimerasa Thermo Sequenase 10 U/ μ l y agua destilada estéril hasta un volumen final de reacción de 27 μ l. Se mezcló suavemente, se centrifugó 5 segundos y se tomó una alícuota de 6 μ l para cada una de las mezclas (dNTP/Cy5ddNTP) hechas anteriormente para cada nucleótido (A, C, G y T). Estas se colocaron en un termociclador (PTC-200 DNA Engine, MJ Research, Waterthow MA, USA) y se les aplicó un programa de 30 ciclos, cada uno de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y 20 segundos, al finalizar se mantuvieron a 4°C.

Para eliminar oligonucleótidos y nucleótidos residuales, se realizó cromatografía de exclusión de tamaño utilizando de columnas AutoSeq G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) que contienen Sephadex G-50. Las reacciones se llevaron a un volumen de 25 μ l, agregando 17 μ l de agua destilada estéril y se colocaron en las columnas, se centrifugaron 1 minuto a temperatura ambiente a 12,000 \times g y la muestra ya purificada se recolectó en el tubo de soporte de la columna. A cada muestra se agregó 8 μ l de solución "stop" (formamida deionizada 100% y Dextran Blue 2000, 5 mg/ml) y se redujo el volumen total a 4-8 μ l secando parcialmente al vacío en un concentrador SpeedVac.

Estas muestras se calentaron por 3 minutos a 72°C, se colocaron en hielo y se cargaron en un gel de secuenciación Repro Gel Long Read (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) al 7% de poliacrilamida (p/v) y buffer TBE 1.5X (Stock 5X: 54g de Trizma base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.5M, pH 8), conteniendo agente desnaturizante y agente entrecruzante que polimeriza a la exposición a la luz UV (Patente No. SE 9604730-3). Los parámetros de corrida de la electroforesis fueron 1500 V, 60 mA, 55°C y 750 minutos como tiempo de corrida. Las secuencias nucleotídicas obtenidas, fueron depuradas de las secuencias del vector que contenía al fragmento de interés, y analizadas por comparación con bases de datos por medio del algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1990), utilizando la opción BLASTN que hace comparación directa entre secuencias de nucleótidos y la opción BLASTX que hace una traducción a secuencias aminoacídicas en los 6 marcos de lectura. Se utilizó la base de datos de NCBI (GenBank) depositada en Internet (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.gov/blast>).

Diseño de Oligonucleótidos Específicos de CuZnSOD de Camarón

Una vez obtenida la secuencia de un fragmento interno de 289 pb con gran similitud a CuZnSOD, se diseñaron oligonucleótidos específicos para esta secuencia siguiendo las recomendaciones de Innis *et al.* (1990), ubicados en los extremos 5' y 3' de la secuencia obtenida. Estos fueron sintetizados por Genosys (SIGMA), y las secuencias son las siguientes:

	Oligonucleótido	sentido	(SODNFw)
	5'-TGGGTTCCACGTGCACGAATTC-3'		
		antisentido (SODNRv)	5'-TGGTCG-
			CCTGGCCGAAATCG-3'

(Tabla 1). Estos oligonucleótidos se utilizaron para la preparación de sonda marcada con digoxigenina por medio de PCR que se describe mas adelante.

Preparación de Sonda Marcada de CuZnSOD para Hibridización

Una vez que se tuvo la certeza de que el fragmento de 289 pb corresponde al gen de la CuZnSOD, éste se utilizó para preparar una sonda marcada y realizar la búsqueda del gen correspondiente completo en el banco de cDNA de hepatopáncreas de cararón blanco, existente en el laboratorio de la Dra. Yepiz-Plascencia. El método de marcaje utilizado, que no es radioactivo, se basa en la síntesis de una cadena complementaria al DNA que se utiliza de templado, en el cual se incorporan uracilos que están unidos covalentemente a un esteroide hapteno llamado digoxigenina (DIG-11-dUTP), en lugar de timidinas. Este marcaje se realizó por tres métodos diferentes que se describen a continuación.

Marcaje con Digoxigenina Utilizando Oligonucleótidos al Azar

El DNA utilizado para preparar la sonda, provino del DNA plasmídico de uno de los clones obtenidos anteriormente, el cual se sometió a digestión con *EcoRI* para liberar solo el segmento perteneciente al gen de CuZnSOD. Se realizó una electroforesis de los productos de la digestión en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich) al 1.5%, se cortó el segmento del gel y se purificó el fragmento de SOD por hidrólisis de la agarosa con β -agarasa (1 U/ μ l, New England, Bio Labs).

En este procedimiento de purificación, el fragmento de agarosa que contiene a la banda de DNA, primeramente se fundió a 70°C por 10 min y, a ésta temperatura en que la agarosa sigue fundida, se agregó Buffer 10X para β -agarasa y agua estéril. Las cantidades utilizadas de buffer y agua se calcularon en base al volumen de la agarosa al 1.5% del fragmento, calculándose el volumen final para que quede diluida al 1% y diluyéndose con buffer 10X (que en la mezcla sea 1X) y el resto con agua. Esto se mezcló y se dejó enfriar un poco, sin dejar que solidificara, y se agregó 1 μ l de la enzima β -agarasa (1 U/ μ l) por cada 100 μ l de mezcla; se incubó a 40°C por 1 h y al terminar se puso en hielo y se añadió 1/10 del volumen de la mezcla de acetato de sodio

3 M, pH 5.2. Se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 12,000 x g, después se pasó el sobrenadante a otro tubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol. Esto se mezcló en vortex, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se desechó para lavar el pellet con etanol al 80%. Al final el pellet se secó al vacío y se resuspendió en 17 µl de buffer TE (Tris HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM). Se analizaron 2 µl por electroforesis en gel de agarosa y por comparación con un estándar de Lambda DNA digerido con *Hind*III (50 ng/µl: 23,130; 9,416; 6557; 4,361; 2,322; 2,027; 564 y 125 pb) (New England Biolabs), se calculó de manera aproximada la cantidad de inserto para marcar.

El DNA correspondiente al gen de la CuZnSOD ya purificado, se utilizó para obtener sonda marcada con digoxigenina (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer Mannheim, Alemania), usando el segmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y oligonucleótidos al azar ("random primers") que se utilizan como iniciadores de las cadenas en síntesis. Para obtener la sonda marcada con digoxigenina, se utilizaron 0.75 µg de DNA templado (fragmento de 289 pb) en un volumen de 15 µl los cuales se desnaturalizaron calentando por 10 min en agua hirviendo y sumergiendo en hielo inmediatamente después. Se agregaron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos, 2 µl de una mezcla de dNTPs y 1 µl de enzima Klenow (todos provenientes del sistema para marcaje con digoxigenina antes mencionado). Estos componentes se mezclaron bien y se incubaron por 1 h a 37°C y para detener la reacción se agregaron 2 µl de EDTA 0.2 M, pH 8.0. Se precipitó el DNA marcado con 2.5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol a -20°C, luego se dejó a -70°C por media hora, se centrifugó por 15 min a 10,000 x g y el precipitado se lavó una vez con etanol al 70% frío. El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

La sonda obtenida se cuantificó por medio de un "dot blot". Para esto se realizaron diluciones seriadas 1:10 de la solución que contiene a la sonda, desde 1 ng/µl hasta 0.01 pg/µl. De la misma manera se hicieron diluciones para una solución de DNA control (proveniente del kit de Digoxigenina) de concentración conocida. Se agregó 1 µl de cada dilución a un rectángulo de membrana de nylon (Hybond-N +, Amersham Pharmacia

Biotech) y se hizo lo mismo con el DNA control. Por comparación entre las intensidades del color en los puntos de diferente concentración de muestra en la membrana, se obtuvo la cantidad aproximada de sonda marcada.

La detección de la sonda hibridizada, se realizó de la siguiente manera: La membrana con las muestras se incubó por 30 min en un buffer de bloqueo 1X obtenido a partir de un stock de reactivo de bloqueo del kit de digoxigenina preparado al 10 % p/v en buffer de ácido maléico (ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5). Posteriormente se incubó por 30 min en una solución de bloqueo 1X con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina 1:5000 (anti-DIG-AP, kit de digoxigenina). A continuación se lavó la membrana con un buffer de lavado de ácido maléico y 0.3% de Tween 20 (v/v) y después se equilibró por 5 min en buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1M, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5). Por último se incubó la membrana en una solución para desarrollo de color (200 µl de reactivo NBT/BCIP del kit de digoxigenina en 10 ml de buffer de detección) en oscuridad hasta observarse el desarrollo de color. La reacción se detuvo enjuagando la membrana en abundante agua destilada.

Marcaje por PCR con los oligonucleótidos T7 y M13R

Otro procedimiento que se utilizó para obtener sonda marcada con digoxigenina, fue por medio de PCR. Para esto se usó como templado el plásmido del clon recombinante (30 ng) dentro del cual se encuentra el fragmento de 300 pb, y para amplificarlo se utilizaron los oligonucleótidos T7 (5'-GTAATACGACTCA-CTATAGGGC-3') y M13 Rev (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'), los cuales se encuentran adyacentes al sitio múltiple de clonación del vector pCR 2.1-TOPO. Se utilizó la mezcla para marcaje del kit de Digoxigenina que contiene al dUTP marcado con DIG, además de los dNTPs por separado, y se aplicaron las condiciones de PCR del programa 2 (Tabla 2) en un termociclador Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA).

Dado que las secuencias del vector que reconocen los oligonucleótidos T7 y M13 Rev, no se encuentran inmediatamente adyacentes al inserto, sino que existen segmentos de vector entre estas secuencias y el inserto, el tamaño de los productos de PCR fue de aproximadamente 480 pb (90 pb de secuencia de vector unidos a cada lado del inserto). Por esto se realizaron digestiones con *EcoRI* para eliminar dichos fragmentos de vector, antes de utilizarse como sonda en el cribado ("screening") del banco de genes. La detección y cuantificación de la sonda se realizó como se describió anteriormente.

Marcaje por PCR con oligonucleótidos específicos

Para este procedimiento se utilizaron oligonucleótidos que se diseñaron específicamente para la secuencia del fragmento de 300 pb de CuZnSOD (SODNFw y SODNRv). Las condiciones de amplificación en el termociclador MJ Research fueron las del programa 3 (Tabla 2). En este caso se utilizó para marcar DIG-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en una concentración final en la reacción de 33 μ M, y se agregaron por separado el resto de los dNTPs. Las reacciones de PCR contenían 2.5 μ l de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3), 3.75 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de dNTPs (2.5 mM c/u), 2 μ l de oligonucleótido SODNFw 20 μ M, 1 μ l de oligonucleótido SODNRv 20 μ M, 2 μ l de polimerasa *K-Taq*.

El producto de PCR ya marcado, se purificó a partir de un gel de agarosa al 1.5% por medio del sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, EUA). Para esta purificación después de la electroforesis de los productos de PCR, la banda correspondiente a la sonda marcada se cortó del gel de agarosa y se le agregó un buffer QG (que contiene tiocianato de guanidina) en una proporción 3 a 1 del volumen del fragmento cortado de agarosa. Esto se incubó a 50°C por 10 min o hasta que la agarosa se disolviera completamente y se agregó 1 volumen de isopropanol igual al volumen del fragmento cortado.

Esta mezcla se aplicó a una columna QIAquick y se centrifugó por 1 min a 10,000 x g. En este paso el DNA se une a la membrana con sílica que contiene la columna y los

contaminantes o DNA de tamaño pequeño, pasan a través de ella. Se descartó el sobrenadante y la columna se lavó con 0.75 ml de buffer PE, centrifugando por 1 min a $10,000 \times g$, y por último se eluyó el DNA de la membrana agregando 30 μ l de agua deionizada estéril a la columna y centrifugando a las mismas condiciones. Para tener una aproximación de la cantidad de sonda purificada, en un gel de agarosa al 1.5% se cargó 1 μ l de muestra y 1 μ l de marcador de DNA de bajo peso molecular (Gibco Life Technologies, Gaithersburg MD, EUA) y por comparación de la intensidad de la banda con el marcador, se calculó la concentración de la sonda. La cuantificación de la sonda se realizó como anteriormente se describió.

Búsqueda del gen completo de CuZnSOD en el Banco de Genes de cDNA

Un banco de genes de cDNA (DNA complementario) contiene la información expresada en el RNA mensajero de un organismo o tejido en particular, donde el cDNA se encuentra insertado dentro de un vector autoreplicable (fago). Con esta información disponible en forma de banco de genes de cDNA, se pueden aislar segmentos individuales procesados provenientes de la información genética original. Para el aislamiento de posibles genes o fragmentos de CuZnSOD, se realizaron búsquedas o "screenings" en un banco de genes, como se describe a continuación.

El "screening" primario se realizó usando el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas de camarón blanco (título de 1.1×10^9 pfu/ μ l) construido anteriormente en este laboratorio, usando el sistema ZAP Express cDNA Synthesis (Stratagene, La Jolla CA, USA). Para el "screening" se utilizó el método de hibridización con sonda marcada con digoxigenina (DIG DNA Labeling and Detection kit, Boheringer) en membranas de nylon Hybond N+. Primeramente se realizó la infección de células XL1Blue MRF', previamente cultivadas en 10 ml de caldo LB suplementado con 100 μ l de $MgSO_4$ 1 M y 100 μ l de maltosa 20%, e incubadas a 37°C y 200 rpm por ~16 h. Estas células se centrifugaron, se ajustó su absorbancia (600 nm) a 0.5 con $MgSO_4$ 10 mM y

200 μ l de ellas se infectaron con 4.5 μ l de una dilución 1:10,000 del banco de genes de cDNA (1.1×10^8 pfu/ μ l) por 25 min a 37°C.

Esta mezcla de infección se agregó a 8 ml de agar NZY fundido y equilibrado a 55 °C y se vertió sobre la superficie de 5 placas con agar NZY de 150 mm previamente solidificado. Se incubaron las placas a 42°C hasta la aparición de zonas de lisis bacteriana. Se calculó contar con 50,000 ufp (unidades formadoras de placa) por cada caja petri de 150 mm de acuerdo al título del banco de genes. El DNA de las bacterias infectadas con el bacteriófago, se transfirió a membranas de nylon y se sometió a un proceso de desnaturalización y neutralización siguiendo el protocolo del manual del ZAP Express cDNA Synthesis kit (Stratagene, La Jolla CA, USA). Para la desnaturalización se sumergieron las membranas en una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M, durante 2 min, luego se neutralizaron en una solución de NaCl 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0). Finalmente se enjuagaron por 30 seg en una solución de Tris-HCl 0.2 M y 2X SSC (NaCl 1.75% y citrato de sodio 0.88 %).

Después de esto, se fijó el DNA a la membrana por medio de radiación ultravioleta (Crosslink), utilizando una cámara de radiación UV (GS Gene Linker, BioRad) a 150 mJoules, por dos ciclos de 30 seg. La hibridización se realizó de acuerdo al protocolo del DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boheringer Mannheim), como se describe a continuación.

Se utilizaron 30 ng de sonda marcada con digoxigenina en 50 ml de solución de hibridización (5X SSC, N-laurilsarcosina 0.1%, SDS 0.02%, reactivo de bloqueo 1%) y se incubaron por toda la noche (16-20 h) a 68°C en agitación (Reciprocal Shacking Bath, Precision Scientific, Chicagi Illinois, EUA). Al día siguiente se lavaron 2 veces por 5 min con una solución de 2X SSC y 0.1% de SDS a temperatura ambiente, luego dos veces por 15 min en 0.1X SSC y 0.1% SDS a 68°C con agitación constante. Por último se realizó la detección con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina, como se explicó anteriormente, dejando en incubación con la solución para desarrollo de color (NBT y BCIP) durante toda la noche, sin agitación y protegido de la luz. La reacción se detuvo con un lavado en agua y se observaron los resultados.

Las placas que se presentaron reacción positiva se llevaron a un "screening" secundario. Se localizaron las placas positivas de la membrana en el cultivo de la placa de Petri, se cortó en círculo el agar de las zonas ubicadas y estos fragmentos se colocaron en un microtubo con 1 ml de buffer SM (NaCl 0.58%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, 5 % de Tris-HCl 1 M, pH 7.5, 0.01 % de gelatina) y 40 µl de cloroformo, se mezclaron en vortex y se dejaron a temperatura ambiente por al menos 2 h y se guardaron a 4 °C. De esta forma se eluyeron los fagos que contienen el fragmento de DNA de interés y que se aislaron por medio de la sonda en un "screening" primario.

Para el "screening" secundario se utilizaron los fagos eluidos anteriormente, realizando el mismo procedimiento del "screening" primario. De cada una de las alícuotas de fagos eluidos se hicieron dos diluciones (1:10 y 1:100) en buffer SM y se agregó 1 µl de cada dilución a las células para infectar. Los procedimientos de hibridización y detección se realizaron como anteriormente se describió. En ocasiones posteriores se realizaron otros "screenings" en los que se manejaron algunas modificaciones al método que se ha descrito, que fueron: en el procedimiento de detección, el tiempo de bloqueo se aumentó a 1 hora y el tiempo de incubación con el anticuerpo conjugado anti-DIG-AP se aumentó a toda la noche a 4°C.

Excisión *In vivo*

En este procedimiento, los recombinantes potenciales contenidos en un bacteriófago (en este caso del banco de genes), son transformados a un plásmido o vector llamado pBK-CMV, por un sistema de excisión y recircularización *in vivo* en las bacterias *E. coli* utilizando un bacteriófago ayudador (helper phage) (Stratagene, La Jolla CA, USA). El plásmido recombinante es mucho más fácil de purificar que los sistemas basados en bacteriófagos y se utiliza para análisis posteriores del inserto.

De las zonas de lisis que se observaron potencialmente positivas se eluyeron los fagos que contenían cDNA y que se utilizaron para transformar *E. coli*. Se cultivaron células

E. coli XL1Blue-MRF' y XL0LR en caldo NZY (NaCl 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, extracto de levadura 0.5%, NZ amina 1.0%, pH 7.5), en el caso de XL1Blue-MRF' se suplementó con maltosa al 0.2% y MgSO₄ 10 mM. Ambos cultivos se incubaron a 30°C y 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron a 1000 x g por 5 min y se resuspendieron en MgSO₄ 10 mM a una densidad óptica $A_{600\text{ nm}} = 1.0$.

En un tubo se combinaron 200 µl de células XL1Blue-MRF' con densidad óptica de 1.0, 250 µl del stock de fago (proveniente del "screening") y 1 µl de ExAssist Helper phage ($>1 \times 10^6$ pfu/ µl) (Stratagene, La Jolla CA, USA), y se incubaron a 37°C por 15 min. Después de esta incubación, se agregó 3 ml de caldo NZY y se incubaron por 2.5-3 h a 37°C con agitación, se calentó a 65-70°C por 20 min y se centrifugó el tubo a 1000 x g por 15 min. El sobrenadante (que contiene al vector pBK-CMV cortado y empaquetado como partículas filamentosas del fago) se decantó en un tubo estéril.

Se agregaron 200 µl de células XL0LR de densidad óptica de 1.0 a 2 tubos y en cada tubo se colocó 10 y 100 µl del sobrenadante. Esta mezcla se incubó a 37°C por 15 min, luego se les adicionó 300 µl de caldo NZY y se incubaron a 37°C por 45 min. Para crecer en placa se agregaron 200 µl de cada mezcla en cajas Petri con agar LB adicionado con kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias que aparecen en las cajas Petri contienen al vector pBK-CMV circularizado y de doble cadena con el inserto de DNA clonado. Estas se analizaron posteriormente por electroforesis de DNA superenrollado.

Análisis de Recombinantes por Electroforesis de DNA Superenrollado

Por medio de las diferencias en la migración del DNA superenrollado en geles de agarosa, se puede detectar de forma rápida los plásmidos recombinantes provenientes de los posibles clones positivos (Yepiz-Plascencia, 2000). Las colonias seleccionadas se inocularon con un palillo de madera estéril en 5 ml de caldo SOB (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5mM, MgCl₂, pH 7) adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se hizo una réplica de cada colonia en placas Petri con agar LB con

ampicilina 100 µg/ml. Tanto placas como tubos de cultivo se incubaron toda la noche a 37°C; los cultivos líquidos, con agitación a 200 rpm.

De cada tubo se tomó 1 ml y se centrifugó a 12000 *x* g por 2 min. El sobrenadante se descartó en cloro al 10% y el precipitado se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) mezclando en vórtex (Thermoline, Debuque IA, EUA). Se agregó 100 µl de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente en el vórtex y se centrifugó por 1 min a 12,000 *x* g a temperatura ambiente.

De la fase superior (acuosa) de cada muestra, se tomaron 10 µl y se agregó 1 µl de RNasa (10 mg/ml), se agitaron suavemente y se dejaron reposar por 5 min. Después se agregaron 2 µl de buffer muestra 6X para DNA (Sambrook *et al.*, 1989) y se cargaron en un gel de agarosa al 1%. Se incluyó un estándar de DNA superenrollado (Supercoiled DNA ladder: 16120, 14174, 12138, 10102, 8066, 7045, 6030, 5012, 3990, 2972 y 2067 pb; Gibco BRL, Gaithersburg MD, EUA). Se corrió la electroforesis hasta que el azul de bromofenol alcanzó las ¾ partes del gel y se tiñó con bromuro de etidio. De aquellas colonias en las que se observó plásmido recombinante se tomó 1.5 ml y se hizo extracción de DNA plasmídico como anteriormente se describió.

Digestión con Endonucleasas de Restricción

Los clones positivos provenientes del "screening" secundario y la excisión *in vivo*, se analizaron utilizando diferentes enzimas de restricción para ver la consistencia en los tamaños de los fragmentos. Las enzimas utilizadas fueron: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *ApaI*, *KpnI*, *Sall*, *SmaI* (Gibco BRL, Gaithersburg MD, EUA); *XhoI* (New England BioLabs) y *PvuII* (Boehringer Mannheim Alemania). En todos los casos se utilizaron 3 µl de DNA plasmídico, 0.5 µl (5 U) de enzima, 1.5 µl de buffer para la enzima, se llevaron con agua a un volumen final de 15 µl y se incubaron a 37° C por 1.5 h. Los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, cargando toda

la muestra digerida con 1 μ l de buffer carga para DNA 6X a un voltaje de 75. Se tiñeron y analizaron los geles de agarosa como ya se describió anteriormente.

Amplificación con Oligonucleótidos Específicos para CuZnSOD

Para aumentar la certeza acerca de la presencia de la secuencia para CuZnSOD en los posibles clones positivos provenientes del "screening" y de la excisión *in vivo*, se realizaron amplificaciones utilizando oligonucleótidos específicos para el fragmento interno de 289 pb de CuZnSOD, descritos anteriormente. Las reacciones de PCR contenían 2.5 μ l de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3), 3.75 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de dNTPs (2.5 mM c/u), 2 μ l de oligonucleótido SODNFW 20 μ M, 1 μ l de oligonucleótido SODNRV 20 μ M, 2 μ l de polimerasa *K-Taq* y en todos los casos se utilizaron 4 μ l de stock de fagos como DNA molde en reacciones de PCR de 25 μ l. Las condiciones de amplificación fueron las del Programa 4, que se muestran en la Tabla 2. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en agarosa como ya se describió.

Diseño de Oligonucleótidos Degenerados para CuZnSOD

Estos se diseñaron en base a alineaciones de secuencias aminoacídicas reportadas en el banco de datos GenBank de la NCBI (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para la proteína completa de CuZnSOD. Se tomaron en consideración las siguientes secuencias de las moscas de la fruta *Drosophila saltans* (AAA81021), *Drosophila hydei* (AAA82055), *Drosophila virilis* (P10791), *Drosophila willistoni* (P41973), *Drosophila paulistorum* (AAD01729), *Drosophila melanogaster* (P00444), vara de San José *Solidago canadensis* (O04996), maíz *Zea mays* (P11428) y arroz *Oriza sativa* (P28757). Los aminoácidos que se consideraron para el oligonucleótido sentido (CuZnSODFW3) fueron MVVKAVCV, que contiene a la metionina inicial y corresponden a los aminoácidos 1 al 8 de *D. virilis*, *D. willistoni* y *D.*

melanogaster; y del 1 al 7 en los demás. Para el oligonucleótido antisentido (CuZnSODRv3) se tomaron en cuenta los aminoácidos GVIGIAKI correspondientes a los aminoácidos 147 al 155 en *D. saltans*, *D. hydei*, *D. virilis*, *D. willistoni* y *D. paulistorum*; y del 147 al 151 en el resto. Ambas secuencias se tradujeron a secuencia nucleotídica y la secuencia antisentido se convirtió al reverso complemento y se sintetizaron (Genosys, SIGMA) (Tabla 1). En base a las secuencias de los organismos antes mencionados y utilizando estos oligonucleótidos, se calcula un tamaño de 465 pb para el gen de CuZnSOD; pudiendo ser aproximado al tamaño del mismo gen en camarón.

Diseño de oligonucleótidos específicos para GST

Se partió de una secuencia nucleotídica obtenida durante este trabajo para el diseño de oligonucleótidos específicos para un fragmento interno de 362 pb de esta secuencia similar a GST, y se utilizó el programa para diseño de oligonucleótidos Primer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bprimer/primer3.cgi>). Además se calcularon parámetros como temperatura de alineación (T_m), peso molecular, porcentajes de G y C, y formación de estructuras secundarias o “primer dimers” mediante el programa Genosys Oligo Calculations (http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe) (Tabla 1). Se tomó en cuenta también, que estos oligonucleótidos no alinearan con el vector en el que se encuentra el fragmento obtenido, ni en más de dos sitios de la secuencia del inserto. Al oligonucleótido sentido se le llamó GSTFw y al antisentido GSTRv y fueron sintetizados por Genosys (SIGMA).

Detección del mRNA para CuZnSOD y GST por RT-PCR

Para la detección del mensaje de CuZnSOD y GST en diferentes tejidos, se usó transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR). Se

utilizaron muestras de RNA total de hepatopáncreas, hemocitos, músculo, pleópodos y branquias, a partir de las cuales, por medio de transcripción reversa, se sintetizó cDNA. Estas muestras de cDNA fueron proporcionadas por Ma. Gabriela Romo Figueroa y se obtuvieron de acuerdo al método descrito en Tavares-Sánchez (2001).

Detección de mRNA para CuZnSOD

Se utilizó cDNA proveniente de 5µg de RNA total que corresponden a 500 ng de mRNA, de los cuales se usaron 50 ng (2.5µl) de cDNA equivalente a mRNA en las reacciones de PCR para cada tejido. Se incluyeron los siguientes componentes: 2.5 µl de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 3.75 µl de MgCl₂ 25 mM, 3 µl de mezcla de dNTPs 2.5 mM c/u, 1 µl de oligonucleótido SODNfw 20 µM, 0.5 µl de SODNRv 20 µM, 1 µl de *K-Taq* polimerasa y 10.75 µl de agua estéril (25 µl volumen total). Como control se utilizó la amplificación de un fragmento de 500 pb de la proteína ribosomal L21 de *P. vannamei* (GenBank, número de acceso BE188654). Las reacciones de PCR para este control estaban constituidas de la misma forma que las de CuZnSOD, solo que en este caso se usaron los oligonucleótidos L21 Fw (5'-GGGGCTICTTTCCCGTTTCAGC-3') y L21 Rv (5'-GCAATGAACTCATAAGGCAGTGGC-3') diseñados anteriormente a este trabajo (20 µM, 1 µl de c/u). Las condiciones de corrida fueron las del programa 3 (Tabla 2).

Detección de mRNA para GST

En el PCR para GST, también se utilizaron 50 ng de cDNA equivalentes a mRNA de cada tejido, y la reacción estaba compuesta por: 2.5 µl de buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM), 2 µl de mezcla de dNTPs 2.5mM c/u, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de oligonucleótido GSTfw 20 µM, 2 µl de oligonucleótido GST Rv 20 µM, 0.2 µl de polimerasa Platinum *Taq* (5 U/µl) (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA) y 13.3 µl de agua estéril (25 µl volumen total). Se amplificó el gen de la proteína

ribosomal L21 de la misma forma que para CuZnSOD. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 1.5% como ya se describió anteriormente.

Amplificación a partir de DNA genómico con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD.

Para tratar de obtener la secuencia del gen completo de CuZnSOD, se realizaron amplificaciones a partir de DNA genómico de camarón blanco, utilizando oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD diseñados en base a la proteína completa como ya se describió anteriormente. El DNA genómico utilizado fue proporcionado por Padilla Sánchez, Jiménez Vega y Gutiérrez Millán de los laboratorios de los doctores Yépez-Plascencia y Vargas Albores (CIAD, A.C) y fué obtenido como se describe en Felipe-Ortega (2000).

Primeramente se realizaron amplificaciones para camarón blanco (*Penaeus vannamei*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*) y camarón café (*Penaeus californiensis*). Se utilizaron 50 y 150 ng de DNA genómico (0.25 µg/µl) como templado para cada especie, y se realizaron reacciones PCR de 30 µl de volumen total compuestas de 3 µl de buffer PCR 10 X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 4.5 µl de MgCl₂ 25 mM, mezcla de dNTPs 2.5 mM c/u, 1.5 µl de oligonucleótido CuZnSODfw3 20 µM, 1 µl de CuZnSODrv3 20 µM, 1.2 µl de K-*Taq* polimerasa y agua estéril hasta el volumen total. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MJ Research) bajo las siguientes condiciones del Programa 2 (Tabla 2).

Ya que el objeto de estudio en este trabajo es el camarón blanco, para las siguientes amplificaciones sólo se utilizó DNA genómico de camarón blanco. En varias ocasiones se realizaron amplificaciones utilizando las diferentes alícuotas de DNA genómico disponibles, en todas ellas se utilizaron 200 ng de DNA genómico como templado. Se utilizaron dos condiciones de amplificación diferentes (Programas 1 y 2) (Tabla 2) y dos polimerasas comerciales (*Tth* DNA Polimerase 5 U/µl, Boehringer Mannheim y

Thermozyne DNA Polimerase 1 U/ μ l, Invitrogen). Se montaron reacciones de 50 μ l de volumen total: 4 μ l de mezcla de dNTPs 2.5 mM c/u, 1.5 μ l de oligonucleótido CuZnSODFw3, 1.5 de oligonucleótido CuZnSODRv3 y, en el caso de la polimerasa *Tth*, 0.5 μ l de polimerasa y 5 μ l de buffer 10X para *Tth* polimerasa; y cuando se usó polimerasa Thermozyne, 1 μ l de polimerasa y 10 μ l de buffer 5X.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y las bandas obtenidas se cortaron del gel y purificaron por medio de dos protocolos: por hidrólisis con β -agarasa (como ya se describió anteriormente) y por el sistema GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Este sistema se basa en la utilización de un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del DNA de doble cadena a una matriz de fibra de vidrio.

Al fragmento de agarosa cortado se le agregaron 10 μ l de buffer de captura por cada 10 mg de agarosa, se mezcló con vortex y se incubó a 60°C hasta que la agarosa se disolvió por completo (5-15 min). Se centrifugó brevemente, se transfirió la muestra a una columna GFX y se incubó a temperatura ambiente por 1 min; después se centrifugó a 12,000 \times g por 30 seg y se descartó el líquido filtrado. Se agregaron 500 μ l de buffer de lavado a la columna y se centrifugó a 12,000 \times g por 30 seg; se pasó la columna a un tubo nuevo y se agregaron 50 μ l de agua destilada estéril a la columna. Después de incubar a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó a 12,000 \times g y se recuperó el DNA purificado.

Las muestras obtenidas de esta manera, se concentraron al vacío hasta un volumen de 10 μ l y se analizó 1 μ l de cada muestra en gel de agarosa al 1.5 %. En este gel y por comparación con un estándar de DNA de bajo peso molecular Low Mass DNA ladder (117.5ng/ μ l: 2,000; 1,200; 800, 400, 200 y 100 pb) (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), se calculó la cantidad aproximada de DNA obtenida en la purificación.

Obtención de Recombinantes del Fragmento Amplificado por Oligonucleótidos Degenerados para CuZnSOD

La clonación de los productos amplificados por PCR con los oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD, se realizó utilizando el sistema pGEM-T Easy Vector System 1 (Promega, Madison WI, EUA). Este sistema utiliza el vector pGEM-T Easy preparado por digestión con *EcoRV* y es similar al sistema TOPO antes descrito, ya que contiene timidinas en los extremos 3', lo cual aumenta la eficiencia de ligación del inserto al plásmido y previene la recircularización del vector. Es también de alto número de copias, resistente a ampicilina, tiene varios sitios de restricción dentro del sitio múltiple de clonación (SMC) que permiten la obtención del inserto por digestión con una sola enzima. Además contiene al gen *lac Z*, que al ser interrumpido por la inserción del fragmento de DNA es inactivado facilitando la identificación de los recombinantes.

Al igual que en el sistema de clonación TOPO-TA, debe asegurarse que el DNA que se va a ligar al vector, tenga una adenina adicional en el extremo 3'. Para esto, se realizó una adición de esta adenina ("refreshing"). Las muestras purificadas se evaporaron hasta sequedad y se les agregó 5.5 μ l de una mezcla para PCR comercial (PCR Supermix, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) la cual contiene *Taq* DNA polimerasa y todos los componentes necesarios para PCR, también se agregó 0.5 μ l de *K-Taq* (6 μ l volumen total), y se incubaron a 72°C por 20 min.

Ligación y Transformación

Para la ligación del fragmento al vector se utilizaron 3 μ l de la reacción de "refreshing", 5 μ l de buffer de ligación rápido 2X (Tris-HCl 60 mM, pH 7.8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 1 mM, PEG 10%), 1 μ l de vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ l) y 1 μ l de T4 DNA ligasa (3 U/ μ l), (10 μ l volumen final); esta mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C.

Después de la incubación, las reacciones de ligación se centrifugaron brevemente a $13,000 \times g$ y se agregaron 2 μ l de cada reacción a 50 μ l de células de *E. coli* One Shot TOP 10 químicamente competentes, provenientes del sistema TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Estas mezclas se agitaron cuidadosamente y se incubaron en hielo por 20 min, luego se aplicó un choque térmico a 42°C por 50 seg, sin agitar, e inmediatamente se pusieron en hielo durante 2 min. Se les agregó 200 μ l de medio SOC (SOB adicionado con glucosa 20 mM) y se incubaron en forma horizontal durante 1.5 h a 37°C con agitación (200 rpm) en un agitador orbital.

Pasado este tiempo, se sembraron esparciendo 50, 100 y 150 μ l de cada muestra sobre la superficie de placas de agar LB con ampicilina (100 μ g/ml) e impregnadas con 40 μ l por placa de IPTG 100 mM y 40 μ l por placa de X-gal 40 mg/ml. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche para obtener los clones.

Análisis de Recombinantes

Para el análisis de clones potenciales positivos se eligieron 20 colonias blancas para cada reacción de clonación y se analizaron por medio de electroforesis de DNA superenrollado y digestiones con *Eco*RI del DNA plasmídico como anteriormente se describió.

Aislamiento de DNA plasmídico. En la extracción de DNA plasmídico se utilizó el método rápido de Lin y Floros (2000), que es una modificación del método de lisis alcalina comúnmente usado. Se utilizaron 1.5 ml de cultivo de cada uno de los posibles clones elegidos, en caldo LB con ampicilina (100 μ g/ml) crecidos durante toda la noche a 37°C. Estos se centrifugaron a $11,000 \times g$ por 1 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió por completo en 100 μ l de buffer de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, 20 μ g de RNasa A). Después se agregó 100 μ l de buffer de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%) y se agitó suavemente, luego se agregaron 120 μ l de buffer de neutralización (acetato de potasio 3 M, pH 5.5), se mezcló suavemente por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a $11,000 \times g$ por 1 min. El sobrenadante se

transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 200 μ l de isopropanol, se agitaron en vortex y se colectó el pellet por centrifugación a 11,000 \times g por 1 min, eliminando el sobrenadante. El pellet se lavó con 500 μ l de etanol al 70%, centrifugando nuevamente, se secó al vacío y se resuspendió en 20 μ l de agua estéril. Para obtener un DNA plasmídico de mayor pureza las preparaciones de DNA obtenidas previamente se limpiaron con fenol-cloroformo, precipitaron con etanol, se secaron y resuspendieron en 20 μ l de agua deionizada estéril.

Digestiones con *EcoRI*. Para separar el inserto del vector, se realizaron digestiones con la enzima de restricción *EcoRI*, ya que es una de las enzimas cuyo sitio se encuentra adyacentes al sitio múltiple de clonación del vector pGEM-T Easy. Se utilizaron 3 μ l de DNA plasmídico, ajustado a una concentración aproximada de 3 μ g/ μ l, y el procedimiento que se realizó es igual al que se describió anteriormente. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%, como también se ha descrito anteriormente, solo que en esta ocasión se utilizó el estándar de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (3,000; 2,000; 1,650; 1,000; 800, 650, 500, 400, 300, 200 y 100 pb, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida del cDNA parcial de la CuZnSOD

Para la clonación del gen de CuZnSOD de camarón, se utilizó una estrategia basada en PCR usando oligonucleótidos degenerados diseñados en base a la secuencia de la CuZnSOD de *D. melanogaster*, ya que ésta proteína es altamente conservada entre las proteínas homólogas. Los productos de PCR de ~300 pb se obtuvieron tanto a partir de amplificación de DNA genómico como del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas (Figura 1); este tamaño corresponde al esperado para el segmento del gen de la CuZnSOD, de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados (SODFw y SODRv).

Después de la clonación de estos fragmentos, se obtuvieron 16 recombinantes potenciales del gen de CuZnSOD, numeradas del 1 al 16, de las cuales las cuatro primeras provenían de genoteca de cDNA de hepatopáncreas y las restantes de DNA genómico. Solo 6 de los posibles 16 clones, liberaron el inserto de ~300 pb al ser digeridos con *EcoRI*, clones 1, 2, 6, 13,14 y 15 CuZnSOD (Figura 2). Esta banda de aproximadamente 300 pb, mostró algunas diferencias en la migración entre los diferentes clones (1, 13 y 15 a una distancia; 14 y 6 a otra, y 2 a otra). Se escogieron los clones 2, 13 y 14, para determinar su secuencia nucleotídica usando los oligonucleótidos T7 y M13 que son complementarios al vector pCR 2.1 TOPO y que son adyacentes al sitio de inserción del fragmento. En el primer acercamiento, la secuencia nucleotídica de 289 pb del clon 14 (llamado pPvCuZnSOD), cuando fue analizada usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) con la base de datos no redundante del NCBI (National Center for Biotechnology Information), presentó la más alta similitud con CuZnSODs de maíz *Zea mays* (46%) y caballo *Equus caballus* (53%), con números de acceso P11428 y P00443 respectivamente.

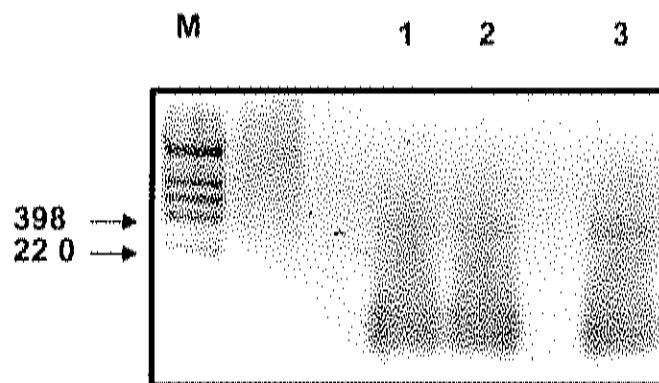


Fig. 1. Amplificaciones con oligonucleótidos degenerados para un fragmento interno de CuZnSOD a partir de banco de genes de hepatopáncreas (carriles 1 y 2) y DNA genómico de camarón blanco (carril 3). La banda de bajo peso molecular en los carriles 1, 2 y 3, corresponde a oligonucleótidos no incorporados. M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder.

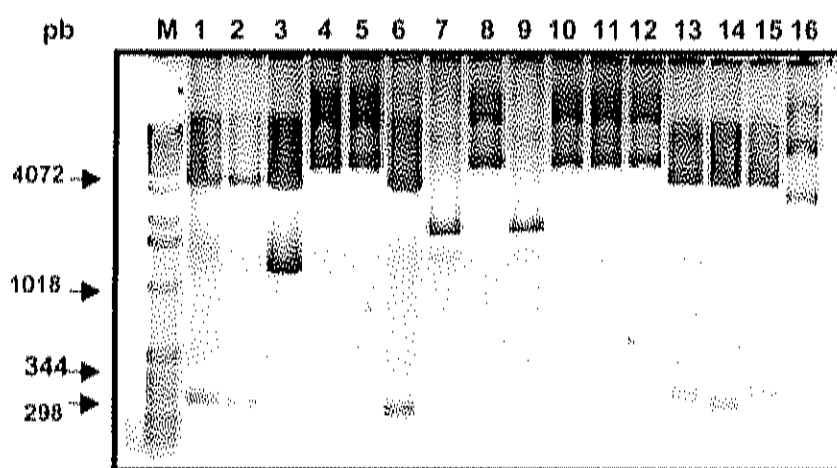


Fig. 2. Análisis de posibles clones de CuZnSOD provenientes de amplificaciones del banco de genes de hepatopáncreas (carriles 1-4) y de DNA genómico (carriles 5-16) digeridos con *EcoRI*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Los insertos liberados, correspondientes a CuZnSOD, se observan de un tamaño de ~ 300 pb (carriles 1, 2, 6, 13, 14 y 15). M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

La secuencia del clon pPvCuZnSOD fué confirmada secuenciando de nuevo ambas cadenas. Esta secuencia se tradujo a secuencia de aminoácidos usando la página web <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate>, resultando en un marco de lectura continuo de 288 bases traducidas a 96 aminoácidos (Figura 3).

Análisis de la secuencia parcial de la CuZnSOD

El análisis de la secuencia aminoacídica parcial, utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul, *et al.*, 1990), reveló la más alta similitud con las proteínas homólogas de *Drosophila saltans* (AAA81021.1) con 66%, ciervo *Cervus elaphus* (AAB88116.1) con 68% y caballo *Equus caballus* (AAC48682.1) con 70% (Tabla 3), sugiriendo el alto grado de conservación de esta gen en los diferentes niveles filogenéticos (Brouwer *et al.*, 1997). Este fragmento se utilizó posteriormente para obtener una sonda marcada para CuZnSOD.

También se alineó la secuencia deducida de aminoácidos con las CuZnSODs de otros organismos por medio del programa de la página web <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/options/clustalw.html>, que utiliza el algoritmo Clustal (Higgins, Bleasby & Fuchs, 1992), donde se pudo observar el alto nivel de conservación entre las secuencias aminoacídicas de este tipo de enzimas (Figura 4). Con lo anterior, se pudo localizar a los aminoácidos involucrados en el sitio catalítico de la CuZnSOD, que son altamente conservados, incluso en organismos filogenéticamente muy distantes, como se ha reportado previamente en la comparación de la CuZnSOD de la levadura marina *Debaromyces hansenii* y la CuZnSOD de eritrocitos bovino (Hernández-Saavedra, 1997).

Así, se localizaron las 6 histidinas que coordinan a los iones metálicos, y que corresponden, por comparación con *Drosophila melanogaster* (CAA35210.1) a los aminoácidos 42, 45, 62, 70, 79 y 119 de la secuencia completa de la enzima.

1 P L E H G F H V H E F G D N T N G C M S
 1 GCGCTCGAGCATGGGTTECACGTCACGAATTCGGAGACAAACACCAATGGTTGCATGTCA
 SODNFw

21 T G A H F N P Y A K T H G G P D A E E R
 62 ACAGGCGCCCACTTCAATCCGTACGCCAAAACTCATGGAGGTCCGGACGCCGAAGAACGC

41 H A G D M G N I V A D E N G E A K V D L
 122 CATGCCGGTGACATGGGAAATATTTGTTGCAGATGAAAATGGTGAGGCCAAAGGTAGACTTG

61 T A T Q I A L S G A L N V V G R S L V V
 182 ACCGCTACGCAAATTCCCCTAAGCGGAGCTTTGAACGTCGTGGGACGTTTCGTTGGTGGTT

81 H A D P D D F G Q G D H E L E R
 242 CACGCTGATCCGGACGATTTTCGGCCAAGGCGACCACGAACTCGAGCCGG
 SODNRv

Fig. 3. Secuencia nucleotídica parcial y deducida de aminoácidos del cDNA de CuZnSOD de *P. vannamei* (pPvCuZnSOD). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados posteriormente para la amplificación de este fragmento están subrayados. Los aminoácidos involucrados en el sitio catalítico de la CuZnSOD se indican en negritas.

Tabla 3. Porcentajes de similitud a nivel de aminoácidos y reemplazos conservados del fragmento interno de 289 pb de CuZnSOD con secuencias homólogas de diferentes organismos

	No. de acceso GenBank	% Similitud	% Reemplazos conservados
<i>Drosophila saltans</i>	AAA81021.1	66	78
<i>Drosophila melanogaster</i>	CAA35210.1	64	72
<i>Drosophila hydei</i>	AAA82055.1	63	75
<i>Drosophila willistoni</i>	AAA57250.1	62	74
<i>Drosophila paulistorum</i>	AAD01729.1	61	75
<i>Aspergillus japonicus</i>	AAA87597.1	60	71
Maíz, <i>Zea mays</i>	AAA33511.1	60	74
Arroz, <i>Oryza sativa</i>	AAC14464.1	60	71
Ciervo, <i>Cervus elaphus</i>	AAB88116.1	68	80
Caballo, <i>Equus caballus</i>	AAC48682.1	70	82

<i>P. vannamei</i>	1	-----PLNIGFHVHETDITNGCCMS
<i>D. paulistorum</i>	1	-----INGDAKCTVPEQEDNGAPVRYTQVITGLKFLIGFHVHETDITNGCCMS
<i>D. willistoni</i>	1	---MVRKAVCVINGDAKCTVPEQEDNGAPVRYTQVITGLKFLIGFHVHETDITNGCCMS
<i>D. saltans</i>	1	-----INGDAKCTVPEQEDNGAPVRYTQVITGLKFLIGFHVHETDITNGCCMS
<i>D. melanogaster</i>	1	---MVRKAVCVINGDAKCTVPEQESSEGTIVKYSQVUCGLAKFLIGFHVHETDITNGCCMS
<i>D. hydei</i>	1	-----INGDAKCTVPEQESDGCPRKVTQVITGLAKFLIGFHVHETDITNGCCMS
<i>C. elaphus</i>	1	MATKAVCVMEKGDGPVQCTVREAKG--RTVVVYTSITDITLGGIGFHVHETDITNGCCMS
<i>E. caballus</i>	1	MALKAVCVLKGIDGPVHGVVHPEQDQEGSPVVQEPPIELTYGDIQFHVHETDITNGCCMS
<i>O. sativa</i>	1	-MVKAVVVLGSSETVKKGTIHFVQRGD-GPTTVTSSVSEGLKPELIGFHVHETDITNGCCMS
<i>Z. mays</i>	1	-MVKAVAVLAG-TDVIKTIHFVQRGD-GPTTVTSSVSEGLKPELIGFHVHETDITNGCCMS
<i>S. canadensis</i>	1	-MVKAVAVLSSSEGVSETVRFQRAEGAPTTVTSSVSEGLKPELIGFHVHETDITNGCCMS
<i>A. japonicus</i>	1	-----NSSEVPIIGFHVHETDITNGCCMS
* * *		
<i>P. vannamei</i>	21	QDAHFNFYAQTGCFDDARSHAGFVGNVVDENSLAKVETTANSTALSSALNVVGRSIVV
<i>D. paulistorum</i>	51	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHLGDLGNVDESGSPTAVNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>D. willistoni</i>	59	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHLGDLGNVDESGSPTAVNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>D. saltans</i>	51	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHLGDLGNVDESGSPTAVNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>D. melanogaster</i>	59	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHLGDLGNVDESGSPTAVNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>D. hydei</i>	51	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHLGDLGNVDESGSPTAVNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>C. elaphus</i>	59	AGPHFNPLSKHGTPKDEBRHVGLGNVYADKNVAKVYVDSLLSLSGHSIIGRTIVV
<i>E. caballus</i>	61	AGPHFNPLSKHGTPKDEBRHVGLGNVYADENSKAEVDYKQEVYSLSEKHSIIGRTIVV
<i>O. sativa</i>	59	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHAGDLGNVYASEEVANVHVVDSQIPITSPHSIIGRTIVV
<i>Z. mays</i>	58	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHAGDLGNVYASEDQVNVNNTDERTFLVANSIIGRTIVV
<i>S. canadensis</i>	60	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHAGDLGNVYVGEESTAKFTVYKQVPIIQAQSIIGRTIVV
<i>A. japonicus</i>	25	EGPHFNFRSKEHGFEDDNRHAGDLGNVYASEEVANVHVVDSQIPITSPHSIIGRTIVV
* * *		
<i>P. vannamei</i>	81	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>D. paulistorum</i>	111	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>D. willistoni</i>	119	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>D. saltans</i>	111	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>D. melanogaster</i>	119	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>D. hydei</i>	111	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAKI-
<i>C. elaphus</i>	119	HEKDDLGGGHELSSTKGNAGARVCCGIGDAQ--
<i>E. caballus</i>	121	HEKDDLGGGHELSSTKGNAGARVCCGIGDAQ--
<i>O. sativa</i>	119	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAQ--
<i>Z. mays</i>	118	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAQ--
<i>S. canadensis</i>	120	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAQ--
<i>A. japonicus</i>	85	HADPDDLGGGHELSSTGNAGARVCCGIGDAQ--

Fig. 4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre CuZnSOD de *P. vannamei* y otros organismos. Las regiones sombreadas en negro representan los aminoácidos idénticos de las CuZnSOD de los diferentes organismos, mientras que las regiones sombreadas en gris representan a los reemplazos conservados. Los aminoácidos involucrados con el sitio catalítico de la enzima se encuentran marcados con asterisco (*).

Se propone que las histidinas 42, 45, y 119 coordinan al cobre, mientras que las histidinas 70, 79 y un residuo de ácido aspártico 82, coordinan al ion de zinc. La histidina 62 es compartida por ambos iones, formando una unión entre ellos. Estos residuos se encuentran señalados en la figura 4. Es notorio en estas secuencias la conservación en las regiones localizadas entre los aminoácidos 44 al 60, y 115 al 130, dentro de las cuales se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de este fragmento. Además de las histidinas, uno de los aminoácidos más conservados es la glicina, la cual se relaciona con el empaquetamiento de la estructura tridimensional de la molécula (Hernández-Saavedra, 1997).

En base a los alineamientos realizados, se esperaría que el tamaño de la CuZn SOD fuera similar, por lo tanto la región caracterizada corresponde al 62% del cDNA, y de esta forma resta por identificar un 38% de la secuencia. En la búsqueda del cDNA completo de la CuZn SOD se utilizaron diversas estrategias mencionadas anteriormente en la sección de materiales y métodos, sin embargo no fue posible obtenerla. En el proceso, se obtuvieron secuencias de otros cDNAs que se describen a continuación, en particular uno correspondiente a GST, otra proteína antioxidante.

Aislamiento y caracterización de un Clon para GST a partir de un Banco de Genes de cDNA de Hepatopáncreas

Adicionalmente al gen de la CuZnSOD, se caracterizó a un clon similar a glutatión S-transferasa (GST), el cual pertenece al mismo grupo de enzimas antioxidantes al que pertenece la CuZnSOD (Mourente y Diaz, 1999) y que se describirá más adelante.

Búsqueda en el banco de genes con sonda marcada de CuZnSOD

En esta búsqueda o "screening", se utilizó una sonda generada para el clon pPvCuZnSOD, marcada con digoxigenina. De un total de 750 ng de DNA, en 50 µl (15

ng/ μ l), que se sometió al marcaje, sólo se obtuvieron 75 ng (1.5 ng/ μ l) marcados, es decir 10 veces menos a la cantidad de DNA sometida a marcaje. Sin embargo, en la prueba de dot blot realizada para medir su comportamiento como sonda, se observó que la señal de hibridización contra sí misma era adecuada. Para el procedimiento de hibridización, es recomendable utilizar de 5 a 25 ng de sonda por ml de solución de hibridización, según el protocolo del sistema utilizado para este tipo de marcaje. En este caso se utilizaron 1.6 ng/ml, debido a la falta de una mayor cantidad de sonda.

Después de la hibridización se pudieron observar señales positivas en las membranas de donde se escogieron 8 posibles positivos en el "screening" secundario, y después de la excisión *in vivo* disminuyeron a 3 (1.1.1, 3.1.1 y 4.2.2). El DNA plasmídico de estos clones se analizó con enzimas de restricción, y no se observó ningún patrón regular, ni bandas que indicaran el tamaño del inserto buscado. Aún así, se tomó uno de ellos, el 3.1.1 y se determinó su secuencia. El análisis de esta secuencia por medio de BLAST no resultó con homología para CuZnSOD en otros organismos, sin embargo mostró una homología a nivel de aminoácidos, de 57% con la secuencia para quitinasa de *Marsupenaeus japonicus* (GenBank, número de acceso 1256180) y 55% con quitinasa de *Penaeus monodon* (GenBank número de acceso 5114426), la cual hasta ahora no ha sido reportada para *P. vannamei*.

Se volvió a realizar "screening" primario del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas, pero ahora utilizando la sonda obtenida por PCR con oligonucleótidos T7 y M13, antes descritos. Se obtuvieron 6 posibles clones, pero al realizar el "screening" secundario, se observaron absolutamente todas las placas positivas. Una posible explicación es que el fragmento ya marcado que se digirió para usarse como sonda, no fue digerido totalmente y los segmentos de vector que pudieran haber quedado unidos al fragmento, reconocieron al vector en el que se encuentra el banco de genes, observándose todas las zonas de lisis como placas positivas.

En un tercer "screening" realizado, y ahora utilizando una sonda marcada por PCR con oligonucleótidos específicos, se tomaron 28 posibles positivos, los cuales se analizaron

por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para CuZnSOD, a manera de "screening" secundario.

Análisis de clones

Una forma de buscar en cuales de esos 28 posibles positivos se encuentra la secuencia para el gen completo de CuZnSOD, es por medio de la utilización de oligonucleótidos específicos, en este caso, para el fragmento interno de CuZnSOD obtenido anteriormente. Se realizaron reacciones de PCR para los 28 posibles positivos y al analizarse en agarosa, en todos ellos se observó una banda de ~ 300 pb, correspondiente al fragmento interno de CuZnSOD (Figura 5), por lo cual se decidió escoger algunos al azar para analizarlos ahora, por PCR con combinaciones de oligonucleótidos específicos y del vector.

Se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos SODNRv / T3 y SODNFw / T7, y se eligieron 8 de los posibles positivos. El tamaño del fragmento para SODNRv y SODNFw era de 289 pb, y en el vector en el que se encuentran los clones provenientes del banco de genes (pBK-CMV) las distancias del sitio para T7 y T3 al sitio múltiple de clonación (SMC), son 100 y 72 pb respectivamente, por lo cual se esperaba un tamaño mínimo aproximado de 400 pb, para la amplificación con SODNFw / T7, y de 360 pb para SODNRv / T3. Al analizar estas amplificaciones en gel de agarosa, se observó una banda de ~ 500 pb en las combinaciones SODNFw / T7 (Figura 6), y solo en algunos casos se observaron bandas de ~ 800 pb para la combinación SODNRv / T3. Por lo anterior se decidió continuar el análisis por excisión *in vivo*.

Para realizar el proceso de excisión *in vivo*, se eligieron 6 posibles clones (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 4.2 y 4'.5), a partir de los cuales se obtuvieron 30 clones que se analizaron por electroforesis de DNA superenrollado. El tamaño del vector pBK-CMV es de 4518 pb, por lo que se esperaban tamaños mayores en los que contuvieran al inserto, de esta manera se observaron las migraciones en gel de agarosa al 1.5 % (Figura 7) y se eligieron

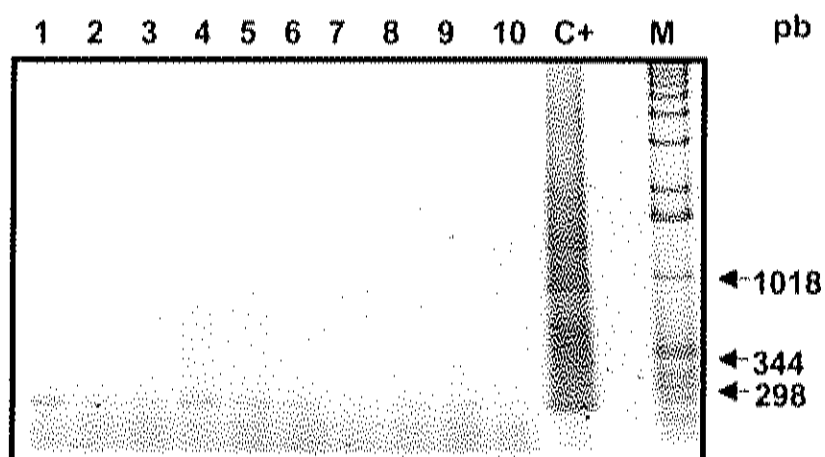


Fig. 5. Productos de amplificación con oligonucleótidos específicos para el fragmento interno de CuZnSOD a partir de los posibles clones positivos provenientes del "screening" del banco de genes de hepatopáncreas. Aquí se muestran 10 de los 28 posibles positivos que tienen la banda de 289 pb esperada. C+: Amplificación a partir del clon pPvCuZnSOD. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

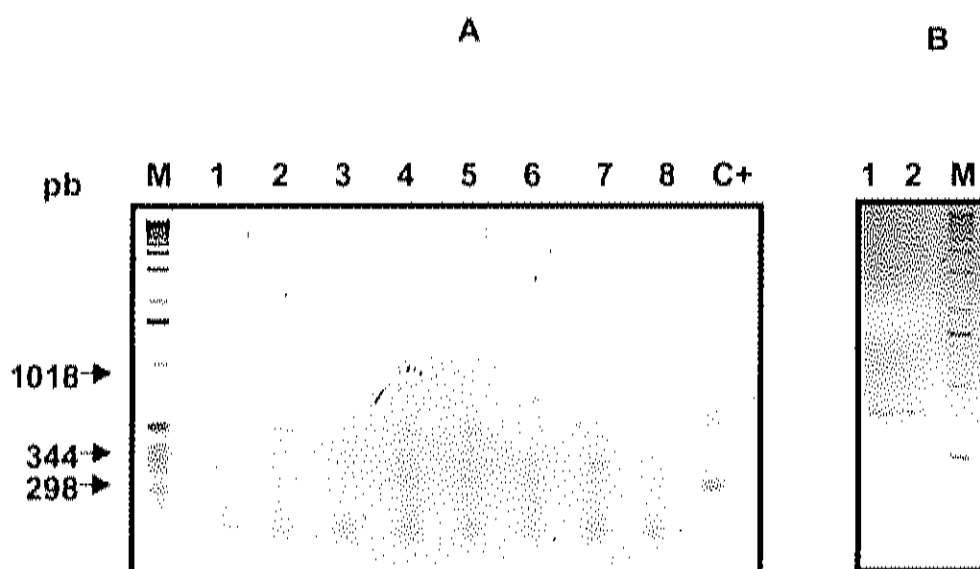


Fig. 6. Amplificaciones a partir de 8 de los clones positivos utilizando combinaciones de oligonucleótidos específicos y del vector. Panel A: Carriles 1-8; amplificaciones para los clones 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 4.2, 6.3, 4'.5 y 5'.7 con oligonucleótidos SOD Fw / T7, donde se muestra una banda de ~500 pb. C+: Amplificación a partir del clon pPvCuZnSOD. Panel B: carriles 1 y 2; amplificaciones para los clones 1.1 y 1.2, con oligonucleótidos SOD Rv / T3, donde se observan bandas de ~800 pb. M: En ambos casos, marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

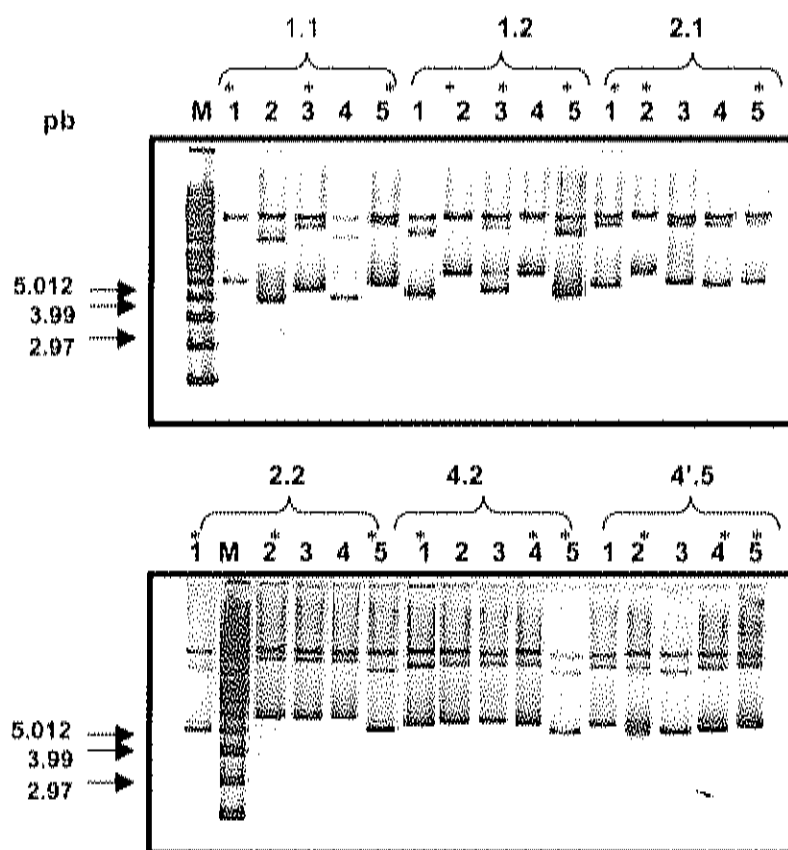


Fig. 7. Electroforesis en agarosa al 1.5 % de DNA superenrollado de 30 clones procedentes de la excisión *in vivo* de 6 posibles clones (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 4.2 y 4'.5). Los asteriscos marcan aquellos 18 clones que mostraron presencia del inserto y fueron diferentes entre sí. M: Marcador de peso molecular para DNA superenrollado.

18 clones que mostraron presencia del inserto y fueron diferentes entre sí. Estos 18 posibles clones se analizaron de nuevo por PCR con combinaciones de oligonucleótidos (SODNFW / T7 y SODNRV / T3), pero en esta ocasión se utilizó como templado la colonia obtenida en el *In vivo* Excision. De los clones utilizados en el PCR se disminuyó el número a 6 que fueron el 3 (1.1.5), 6 (1.2.5), 12 (2.2.5), 13 (4.2.1), 14 (4.2.4) y 16 (4'.5.2), de acuerdo a la presencia de bandas amplificadas (Figura 8).

De estos últimos se aisló DNA plasmídico, cada muestra se digirió con *XhoI*, y se hicieron digestiones dobles con *PstI* / *HindIII* y *PstI* / *ApaI*. Se utilizó *XhoI*, ya que en la secuencia del fragmento de CuZnSOD, se encuentran sitios para esta endonucleasa de restricción ubicados a los 5 y 280 pb de la región secuenciada, por lo cual se esperaba una banda de ~ 275 pb. Además el vector en el que se encuentran estos clones (pBK-CMV) tiene este sitio localizado a 15 pb del SMC, y considerando que es un fragmento interno de un gen completo de ~500 pb, se esperaba, además del vector linearizado, al menos un fragmento de ~ 120 pb.

Las digestiones dobles se hicieron con enzimas que flanquean al SMC del vector pBK-CMV, por un lado *PstI* ubicado a 28 pb del SMC y por el otro lado *HindIII* y *ApaI* a 15 y 41 pb del SMC, respectivamente. Por las consideraciones anteriores para la combinación *PstI* / *HindIII* se esperaban productos de digestión entre 400 y 500 pb, y para la combinación *PstI* / *ApaI* un fragmento de entre 500 y 600 pb, esto además del vector linearizado.

En los geles de agarosa para las diferentes reacciones, sólo en el caso de la muestra 6 (Figura 9) se observó la banda esperada de ~ 275 pb en la digestión con *XhoI*, además de una banda de un poco más de 1000 pb en la digestión con *PstI* / *ApaI*, que también se observó en los demás clones. En la digestión con *PstI* / *HindIII* sólo se observó el vector linearizado en todos los casos. Estos 6 posibles clones fueron secuenciados.

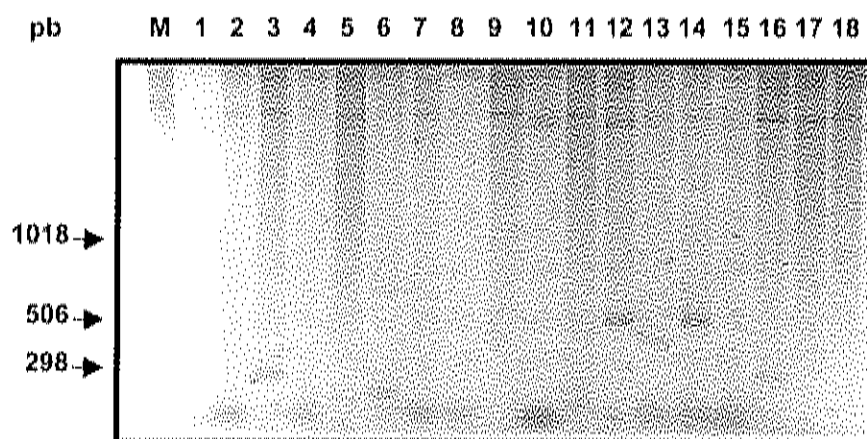


Fig. 8. Amplificaciones a partir de las colonias de los 18 clones procedentes de la excisión *in vivo*, con oligonucleótidos SOD Rv / T3. En los carriles 3, 6, 12, 13, 14 y 16, que corresponden a los clones 1.1.5, 1.2.5, 2.2.5, 4.2.1, 4.2.4 y 4'.5.2 respectivamente, se muestran bandas de amplificación. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

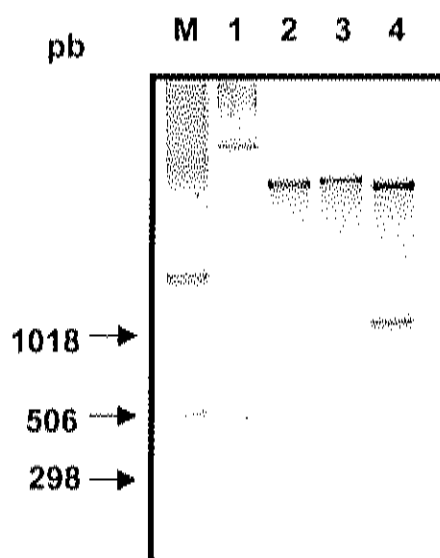


Fig. 9. Digestiones con endonucleasas de restricción para el clon 6 (1.2.5). Carril 1: DNA plasmídico sin digerir. Carril 2: Digestión con *XhoI* donde se observa la banda esperada de ~275 pb. Carril 3: Digestión con *PstI* / *HindIII* donde sólo se observó el vector linearizado. Carril 4: Digestión con *PstI* / *ApaI* donde se observa una banda de un poco más de 1000 pb. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

Análisis de secuencias

Los seis clones putativos se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos T7 y T3 y al ser analizados por BLASTX, ninguno de ellos presentó homología con el gen de CuZnSOD que se buscaba. Los clones 3, 12, 14 y 16, resultaron similares a hemocianina de *P. vannamei*, ya reportada por Sellos *et al.* (1997) y con número de acceso en el GenBank CAB85965, con homologías del 97 al 100%. El clon 13 resultó similar a una proteína unidora a RNA TAR (Trans-activation responsive RNA binding protein), con una homología del 37 % a esta proteína en humano (Q15633) y en ratón (P97473).

La secuencia del clon 6 con un tamaño de 852 pb, fue similar a Glutación S-Transferasa (GST) clase Mu, mostrando homología a nivel de aminoácidos con valores máximos entre el 46 y 56 % con GST's de esta clase en varios organismos. Fue interesante encontrar esta similitud, ya que es una enzima muy relacionada con la CuZnSOD y ambas pertenecen al mismo grupo de enzimas antioxidantes (Mourente y Diaz, 1999), además hasta ahora no hay reportes de la secuencia para esta enzima en camarón blanco, por lo cual se incluyó en este trabajo.

El método mas utilizado para la búsqueda de fragmentos de cDNA contenidos en bancos de genes es por medio de hibridización en membranas, sin embargo es un método laborioso, requiere de mucho tiempo y puede producir falsos positivos. Este fue el caso para la búsqueda del gen de CuZnSOD en el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas. Esto pudo ser debido a una baja cantidad del cDNA de CuZnSOD en el banco de genes, por lo cual, en este caso sería recomendable utilizar bancos de genes contruidos con organismos estimulados, ya que esta enzima es altamente inducible bajo ciertas condiciones (Campa-Córdova *et al.*, 2002) y sería más probable encontrar a este gen.

Análisis de la secuencia similar a GST

A partir de la genoteca de hepatopáncreas de camarón blanco, se obtuvo un clon que al analizarse por BLASTX (Altschul *et al.*; 1990) resultó similar a Glutación S-Transferasa (GST) clase mu, mostrando valores máximos de homología a nivel de aminoácidos, con rata *Rattus norvegicus* (P04905) y conejo *Oryctolagus cuniculus* (P46409), seguidos de ratón *Mus musculus* (P15626) y el hombre *Homo sapiens* (P46439) (Tabla 4). Estas homologías de 55 y 56% se encuentran dentro de los valores que se han encontrado entre secuencias de proteínas de GSTs dentro de una misma clase, que se ha observado que son mayores al 50% (Vuilleumier, 1997; Ketterman *et al.*, 2001).

La secuencia nucleotídica del cDNA del clon de GST de camarón así como su secuencia deducida de aminoácidos se muestran en la figura 10. El primer codon de iniciación ATG correspondiente a la metionina inicial, y dentro del marco de lectura adecuado, se localizó en la posición 22 del extremo 5'. La señal de poliadenilación AATAAA (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1993), que en este tipo de enzimas se ha encontrado traslapado con el codón de terminación TAA en algunos invertebrados (Ranson *et al.*, 1997; Rosa de Lima *et al.*, 2002) no se detectó como tal en esta secuencia. En este caso se encontró un codón de terminación TGA en la posición 645, seguido de una región no traducida 3'UTR de 105 nucleótidos.

```

1           M L P V L G Y W K T R A L
1  GGCACGAGGCACCTCTGAGAGGATGCTGCCCGTTTTAGGCTACTGGAAAACTCGGGCGCTC
14  C Q P I R L M L G Y T G T E F E E K N Y
61  TGCCAGCCCATTCGGCTGATGCTGGGGTACACGGGCACTGAGTTCGAGGAGAAAAACTAC

34  P V G D A P D Y D K S E W L A V K F K L
121 CCTGTGCGCGACGCTCCAGACTACGACAAGAGCGAATGGCTGGCCGTCAAGTTCAAACTC
      GSTFw

54  G L A F P N L P Y Y I D G D V K I T Q S
181  GGCCCTGCGCTTCCCCAACCTTCCCTACTACATCGACGGAGACGTGAAGATAACGCGAGGC

74  K A I M R Y L A R K H G L C G T T P E E
241  AAGGCCATCATGCGCTACCTGGCACGGAAGCACGGCCCTCTGTGGCCGACCGCCGAGGAA

94  L V R T D M I E C Q L T D M H E A F P T
301  CTCGTGAGGACAGACATGATAGAGTGTCAACTGACAGACATGCACGAAGCTTTCTTTACC

114  V T Y E H Y E Q K D A Y T A S L P A K L
361  GTCACTACGAACACTACGAACAGAAGGATGCCTACACGGCCCTCCCTCCCCGCAAGCTG

134  R Q Y S D F L G S R F W F A G D K L T Y
421  AGGCAGTACTCGGACTTCCTCGGCAGCAGACCCTGGSTTCGCCGAGACAAGCTAACCTAC

154  I D F L A Y E I F D Q H L S L D R T C L
481  ATCGACTTCCTGGCCCTACGAGATCTTCGACCAGCACCTCAGCCTCGACCGCACCTTGCCTC
      GSTRv

174  D G F K N L Q A F R R G L R I S R P S R
541  GACGGCTTCAAGAACCCTCCAGGCCCTTCAGAAGAGGTTTTGAGGATCTCGAGGCCATCAAGA

194  S T W R R R S S Q K T D L Q Q V R S V Y
601  AGTACATGGCGTGGCCGAAGTTCACAAAAACCGATTTGCAACAAGTACGCTCAGTTTAC

214  D H *
661  GATCATTCAGGGGAAAAATGAAGCGTTAGATGGCTTGGTTTTTGAAGAGGAAGAAGATACC

241
721  AAATGAAGAGGAGAGAGAACTATATGAAAAGAAAAGATGTGAAGRACCCGGGTCAAGAAAT

261
781  ATACTATTAATTTGGGATTTTTTATATGAGAAAGTAAAAATTTGAGAAAAA

281
841  AAAAAAA

```

Fig. 10. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de GST de *P. vanammei*. Las secuencias de los oligonucleótidos GSTFw y GSTRv se encuentran subrayadas. El asterisco indica el codón de terminación TGA.

Tabla 4. Porcentajes de similitud a nivel de aminoácidos y reemplazos conservados de la secuencia de GST con secuencias homólogas de diferentes organismos

	No. de acceso Swiss Prot	% similitud	% reemplazos conservados
Rata, <i>Rattus norvegicus</i>	P04905	56	70
Ratón, <i>Mus musculus</i>	P15626	55	68
Humano, <i>Homo sapiens</i>	P46439	55	68
Conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	P46409	56	68
Pollo, <i>Gallus gallus</i>	P20136	52	63
Cobayo, <i>Cavia porcellus</i>	P16413	55	71
Hamster, <i>Cricetulus longicaudatus</i>	Q00285	53	67
Parásito, <i>Fasciola hepática</i>	P31670	46	58

La secuencia de 852 pb se tradujo a secuencia de aminoácidos usando la página web <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate>, resultando un marco de lectura continuo de 648 pb que codifica para una proteína de 215 aminoácidos, que corresponde a una subunidad de la proteína GST. Utilizando el programa Protean de DNastar se calculó el peso molecular correspondiente a la subunidad, en 25.181 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 8.391. Se han encontrado pesos moleculares muy similares en GSTs de otros organismos (Ranson *et al.*, 1997; Rosa de Lima *et al.*, 2002). La composición de aminoácidos en porcentaje de frecuencia fue: aminoácidos básicos (KR) 13.95%, aminoácidos ácidos (DE) 12.55%, aminoácidos hidrofóbicos (AILFWV) 31.62 y aminoácidos polares (NCQSTY) 26.97%.

La secuencia deducida de aminoácidos se alineó con GSTs de otros organismos por medio del algoritmo Clustal (Higgins, Bleasby & Fuchs, 1992) utilizando programa de la página web <http://searchlauncher.bcm-tmc.edu/multi-align/options/clustalw.html>. Al igual que en la CuZnSOD, se pudo observar el alto nivel de conservación entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas GST (Figura 11). La región del N-terminal de las GST's es altamente conservada, y es en esta región donde se encuentra el sitio de unión al glutatión; mientras que el extremo carboxilo es más variable, y en esta última parte radica la especificidad de la enzima (Vuilluermier, 1997; Ketterman *et al.*, 2001). Como en otras GSTs, la GST de camarón contiene la región altamente conservada FPNLPYYIDGD entre los residuos 58 y 67, y que corresponde al sitio G de unión al glutatión (Rosa de Lima *et al.*, 2002).

Diseño de oligonucleótidos específicos para GST

De acuerdo a la secuencia que se obtuvo similar a GST, se diseñaron oligonucleótidos específicos para un fragmento interno de 362 pb. Para el diseño del oligonucleótido sentido (GST Fw) se utilizó la región PDYDKSE, que corresponde a la secuencia nucleotídica 5' CCAGACTACGACAAGAGCGAATG 3', ubicada a partir del nucleótido 142 de la secuencia obtenida similar a GST; y para el oligonucleótido antisentido (GST Rv) se utilizó la región TYIDFLAY, que corresponde al reverso complemento de 5' GTAGGCCAGGAAGTCGATGTAGG 3', que se encuentra en el nucleótido 475 de la misma secuencia (Figura 10). Estas secuencias aminoacídicas son altamente conservadas entre las GST's de este tipo.

Detección del mensaje de CuZnSOD en diferentes tejidos de camarón

La detección del mensaje de CuZnSOD se hizo por RT-PCR (Innis *et al.*, 1990) a partir de RNA total de 5 tejidos de camarón (hepatopáncreas, hemocitos, músculo, pleópodos, y branquias), lo cual también permitió la comparación de la abundancia del mensaje de CuZnSOD entre estos tejidos. También se utilizó como control y punto de comparación la amplificación de un fragmento de 500 pb de la proteína ribosomal L21 de *P. vannamei* reportada en el GenBank con número de acceso BE188654. La expresión de proteínas ribosomales se utiliza como control, ya que por ser proteínas constitutivas, se espera que estos genes se expresan constantemente y mantengan niveles estables de sus mRNA's (Barillas-Mury *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2000).

Al amplificar el cDNA con los oligonucleótidos SODNFw y SODNRv de CuZnSOD, se esperaba obtener bandas de 289 pb, mientras que con L21 Fw y L21 Rv de la proteína ribosomal L21, de 500 pb. En gel de agarosa se pudo observar la amplificación del fragmento de 289 pb de CuZnSOD en los tejidos hepatopáncreas, hemocitos, músculo y

branquias, no así en pleópodos; mientras que para las amplificaciones del fragmento de 500 pb de L21 se observó la banda del tamaño esperado en todos los tejidos (Figura 12).

Para determinar la abundancia relativa del mensaje de CuZnSOD en los tejidos y contra el mensaje de L21, se utilizó el programa *1D Image Analysis Software* del sistema de fotodocumentación Kodak DC 120 (Rochester NY, EUA) que puede determinar la intensidad de las bandas, permitiendo comparaciones cuantitativas.

En este caso se utilizó el parámetro intensidad media, que es el promedio de la intensidad de los pixeles dentro del rectángulo que define a la banda. De acuerdo a los valores obtenidos, en la expresión del mensaje entre tejidos no hay una diferencia significativa, sin embargo al normalizar por comparación con L21, se observó que el mensaje para CuZnSOD es casi 2 veces menos abundante que para L21 (Tabla 5). Esto indica una baja abundancia del mensaje de CuZnSOD, ya que aunque las proteínas ribosomales son constitutivas, se expresan en abundancia moderada (Barillas-Mury et al., 1999, Yu et al., 2000). Esto apoya la hipótesis de que no se haya encontrado al cDNA completo de la CuZnSOD en el "screening" del banco de genes, debido a la baja cantidad de su mRNA.

Detección del mensaje de GST en diferentes tejidos de camarón

La detección y comparación del mensaje para GST, se hizo de la misma manera que para CuZnSOD. Al igual que para CuZnSOD, se utilizaron 5 tejidos de camarón y a la proteína L21 como control y referencia. En el caso de GST se utilizaron los oligonucleótidos GST Fw y GST Rv para la amplificación de un fragmento interno de 362 pb de la secuencia obtenida anteriormente, similar a GST y L21 Fw y L21 Rv para la amplificación del fragmento de 500 pb de la proteína ribosomal L21. Al analizar en gel de agarosa los productos de amplificación se pudo observar el fragmento de 362 pb de GST en los tejidos hepatopáncreas, hemocitos, músculo y branquias, excepción de pleópodos, tal como sucedió con CuZnSOD (Figura 13).

Al igual que para CuZnSOD, para determinar la abundancia del mensaje de GST comparando entre tejidos y contra el mensaje de L21, se utilizó el programa *1D Image Analysis Software* del sistema de fotodocumentación Kodak DC 120, usando el parámetro intensidad media. De acuerdo a los valores obtenidos, por comparación con L21 se observó que el mensaje para GST es casi 1.5 veces menos abundante que L21, además en la expresión del mensaje entre tejidos se observan diferencias, siendo más abundante el mensaje en hepatopáncreas y branquias (Tabla 5). Esto la ubica como una proteína que se expresa en abundancia menor a las proteínas ribosomales (Barillas-Mury et al., 1999, Yu et al., 2000).

Amplificación con oligonucleótidos degenerados para el gen completo de CuZnSOD

Además de realizar la búsqueda del gen de CuZnSOD en el banco de genes de hepatopáncreas, se utilizó la estrategia de RACE (Amplificación Rápida de los Extremos de cDNA) para la cual se diseñaron oligonucleótidos específicos (CuSOD1Fw y CuSOD1Rv) (Tabla 1), y así obtener los extremos faltantes de este gen. Sin embargo no se llegó al resultado esperado, aunque se obtuvo una secuencia similar a la subunidad I de citocromo c oxidasa, ya reportada para *P. vannamei* y con número de acceso en el GenBank X82503.1. Por lo anterior se intentó la amplificación del gen completo a partir de DNA genómico.

Estas amplificaciones por PCR se hicieron utilizando los oligonucleótidos degenerados CuZnSODFw3 y CuZnSODRv3 diseñados en este trabajo a partir de secuencias conservadas para CuZnSOD de diferentes organismos y con los cuales se esperaba un producto de 465 pb o mayor.

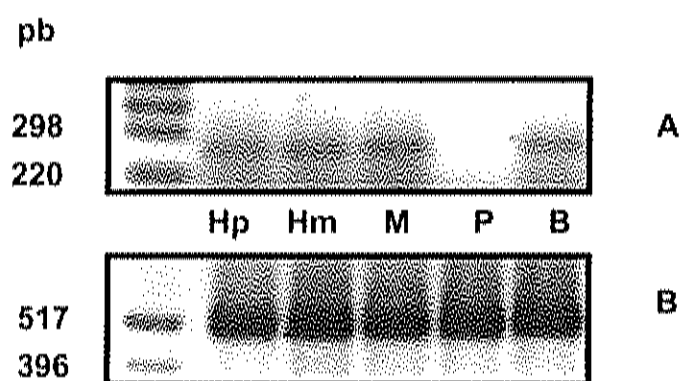


Fig. 12. Análisis electroforético de la expresión del mensaje de CuZnSOD contra una proteína constitutiva en diferentes tejidos. Panel A: Producto de amplificación a partir de 50 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de Hp, Hm, M, P y B utilizando oligonucleótidos específicos para CuZnSOD. Panel B: Producto de amplificación de la proteína constitutiva L21 a partir de 50 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de los mismos tejidos. Hp, hepatopáncreas; Hm, Hemocitos; M, músculo; P, pleópodos y B, branquias.

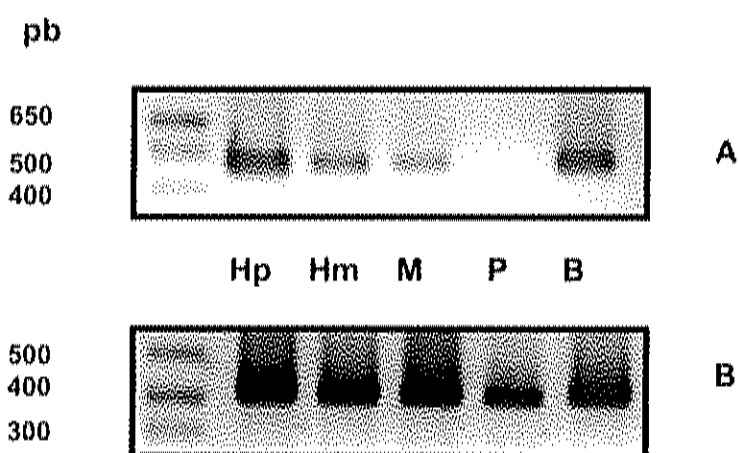


Fig. 13. Análisis electroforético de la expresión del mensaje de GST contra una proteína constitutiva en diferentes tejidos. Panel A: Producto de amplificación a partir de 50 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de Hp, Hm, M, P y B utilizando oligonucleótidos específicos para GST. Panel B: Producto de amplificación de la proteína constitutiva L21 a partir de 50 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de los mismos tejidos. Hp, hepatopáncreas; Hm, Hemocitos; M, músculo; P, pleópodos y B, branquias.

Tabla 5. Comparación del nivel de expresión entre CuZnSOD y GST con la proteína ribosomal L21. Los valores que se muestran para las intensidades medias de CuZnSOD, GST y L21, están dados en pixeles. Hp: Hepatopáncreas; Hm: Hemocitos; M: Músculo; P: Pleópodos y B: Branquias. ND, no determinado

Tejido	Cu Zn SOD			GST		
	L21	SOD	L21/SOD	L21	GST	L21/GST
Hp	235.53	165.35	1.42	222.27	179.73	1.23
Hm	240.65	162.15	1.48	220.60	153.82	1.43
M	239.42	173.73	1.38	222.69	139.91	1.59
P	235.53	0	ND	207.27	0	ND
B	238.69	174.52	1.37	221.50	180.15	1.22

En una primera amplificación utilizando condiciones de baja astringencia y a partir de DNA genómico de camarón blanco (*P.vannamei*), camarón azul (*P stylirrostris*) y camarón café (*P. californiensis*), se obtuvieron productos de diferentes tamaños en las tres especies. Para camarón blanco se obtuvo una banda arriba de los 500 pb, en camarón azul una banda de ~ 400 pb y en camarón café se observaron tres bandas (300, 500 y ~ 700 pb) (Figura 14).

Dado que la amplificación con estos oligonucleótidos produjo bandas en los tamaños esperados, se siguió trabajando pero sólo con camarón blanco, que es la materia de estudio en este trabajo. Se hicieron varias amplificaciones a partir de DNA genómico con estos oligonucleótidos, utilizando varias muestras de acuerdo a su disponibilidad. El número de bandas obtenidas y su tamaño fué variable, sin embargo algunas permanecieron constantes en las diferentes muestras. Estos fragmentos fueron de 350, 500, 650, 850 y 1200 pb (Figura 15), los cuales se purificaron a partir del gel de agarosa y se cuantificaron por comparación con un estándar para DNA, como se muestra en la figura 16.

Para obtener suficiente cantidad de DNA de cada banda, se hicieron varias amplificaciones y purificaciones. Al final se obtuvieron, en total, 57 ng de la banda de 500 pb, 61 ng en la de 650 pb, 82 ng en la de 800 pb y 57 ng en la de 1,200 pb.

Obtención de Recombinantes a partir de productos de amplificación con Oligonucleótidos Degenerados para CuZnSOD

Los productos amplificados anteriormente con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD, se clonaron en el sistema pGEM-T Easy. Para esto se hicieron tres reacciones de clonación, una que contenía el DNA purificado a partir de las bandas de 500 y 650 pb (118 ng), otra con 82 ng de DNA de la banda de 800 pb y la tercera con 57 ng de la banda de 1,200 pb; a las cuales llamaremos A, B y C, respectivamente. De cada una de ellas se obtuvieron colonias transformadas, que se observaron de color blanco

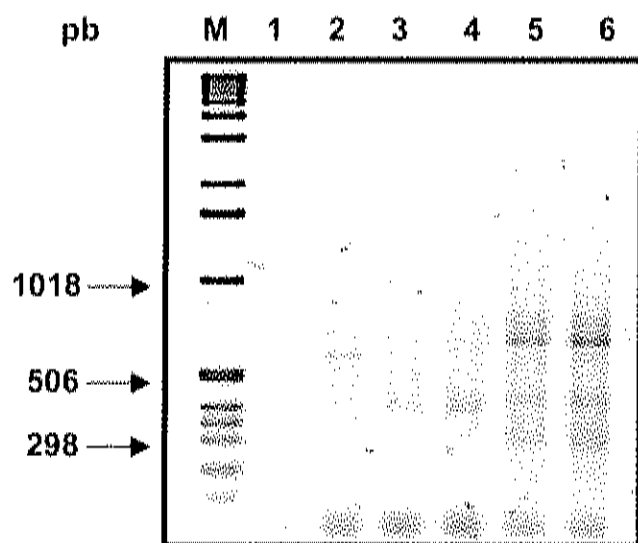


Fig. 14. Productos de amplificación utilizando 50 y 150 ng de DNA genómico de camarón blanco (*P.vannamei*) (carriles 1 y 2), camarón azul (*P. stylirostris*) (carriles 3 y 4) y camarón café (*P. californiensis*) (carriles 5 y 6), con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

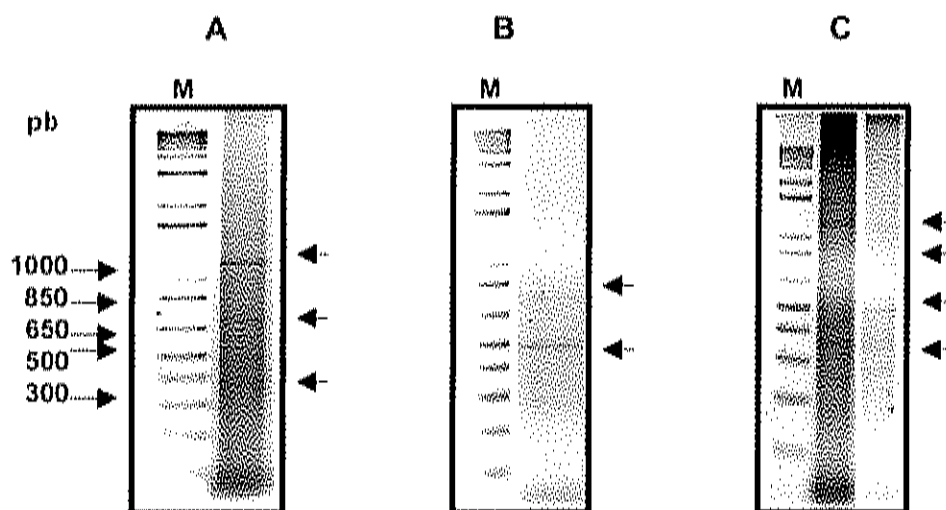


Fig. 15. Amplificaciones a partir de DNA genómico de camarón blanco (200 ng), utilizando oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD. Panel A: Amplificación de bandas de 350, 650 y 1200 pb. Panel B: Amplificación de bandas de 500 y 850 pb. Panel C: Amplificación de bandas de 350, 500, 800 y 1200 pb. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder.

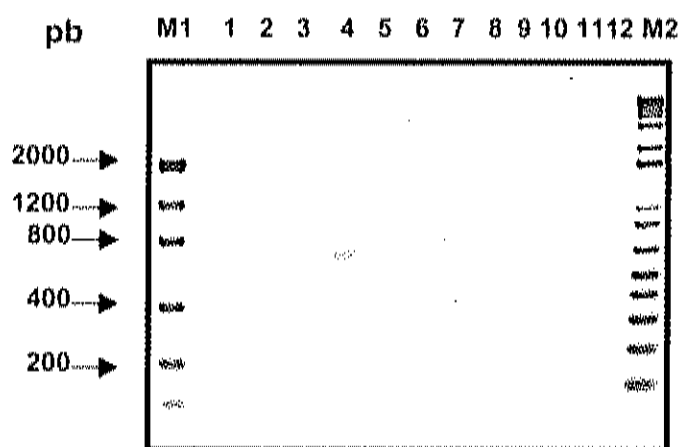


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la cuantificación de las bandas de DNA amplificadas con oligonucleótidos degenerados para CuZnSOD. Carriles 2,3 y 5, banda de 1200 pb. Carriles 1, 6, 7, 8 y 9, banda de 850 pb. Carril 4, banda de 650 pb. Carriles 10, 11 y 12, banda de 500 pb, M1: Marcador de peso molecular Low Mas DNA Ladder. M2: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

de las cuales se eligieron 20 en cada caso y se analizaron por electroforesis de DNA superenrollado (Figura 17). En base a la diferencia en la migración se observaron varias recombinantes y se eligieron 13 posibles clones (4 de la reacción A, 5 de la reacción B y 4 de la reacción C).

De estos 13 posibles clones se aisló el DNA plasmídico y se digirieron con *EcoRI* para liberar los insertos ligados (Figura 18). En todos se observó la presencia de bandas de los tamaños esperados para los insertos clonados. Se eligieron 8 posibles clones (3 de A, 4 de B y 1 de C) y se determinó su secuencia utilizando los oligonucleótidos del vector pGEM-T Easy (M13 Rv y T7). Las muestras fueron: de la reacción A (insertos de 500+650 pb) los posibles clones 1, 3 y 5 (llamados 15, 35 y 55); de la reacción B (800 pb) los clones 1, 2, 4 y 14 (llamados 18, 28, 48 y 148); y de la reacción C (1200 pb) el clon 6 (llamado 612). Sin embargo al analizarse las secuencias por BLASTX (Altschul, et al., 1990), no presentaron homología con CuZnSOD.

La caracterización del cDNA completo de la CuZnSOD por diversas estrategias, no tuvo éxito. Esto podría indicar que este gen de camarón se expresa en bajos niveles y difiere bastante en los extremos 5' y 3', lo que se confirmará en estudios posteriores.

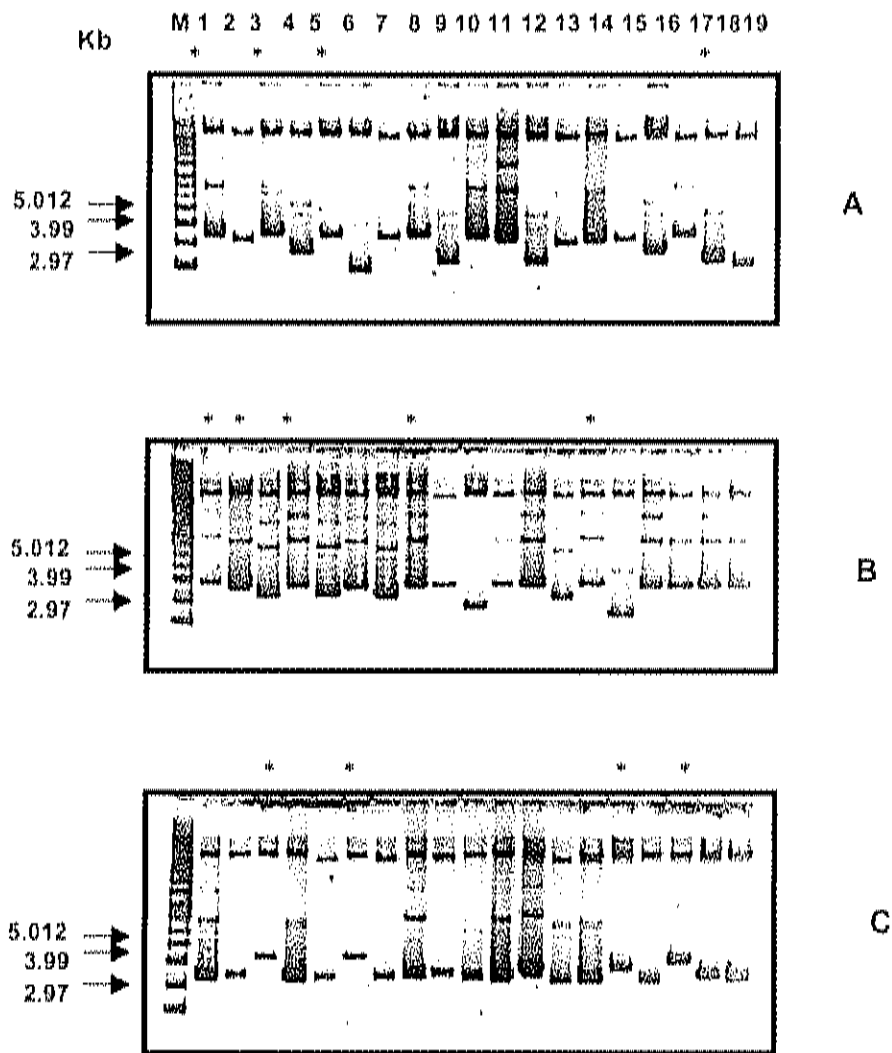


Fig. 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de DNA superenrollado de los clones positivos provenientes de los productos de amplificación con oligonucleótidos degenerados para SOD-Cu Zn. Panel A: Reacción de clonación de los fragmentos de 500 y 650 pb. Panel B: Reacción de clonación del fragmento de 850 pb. Panel C: Reacción de clonación del fragmento de 1200 pb. Las muestras elegidas como posibles positivos están marcadas con *. M: Marcador de peso molecular para DNA superenrollado

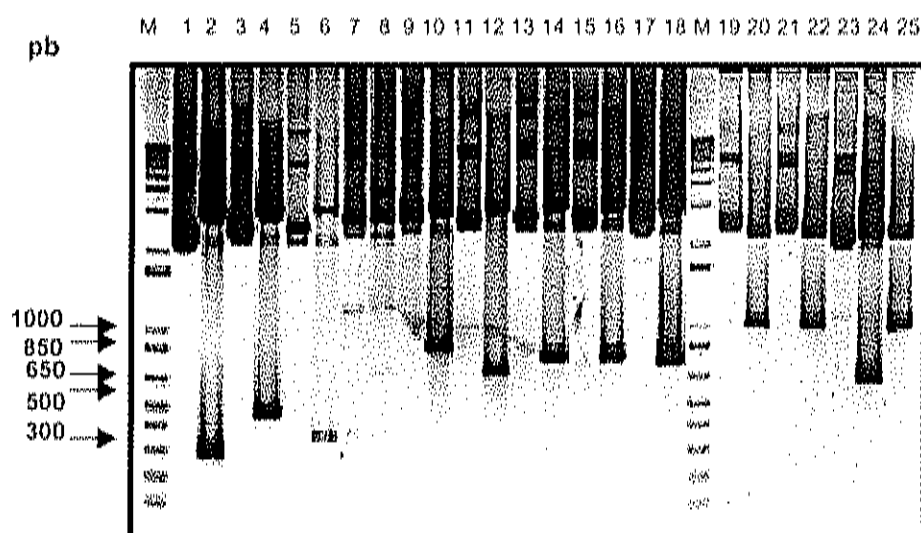


Fig. 18. Digestiones de clones positivos con *EcoRI* para identificación de recombinantes. Carriles impares, muestras sin digerir. Carriles 2, 4, 6 y 8: muestras 1, 3, 5 y 12 digeridas, provenientes de la reacción de clonación para los fragmentos de 500 y 650 pb. Carriles 10, 12, 14, 16 y 18, muestras 1, 2, 4, 8 y 14 digeridas, provenientes de la reacción de clonación para el fragmento de 850 pb. Carriles 20, 22, 24 y 25, muestras digeridas de la reacción de clonación para el fragmento de 1200 pb. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La utilización de sondas marcadas es un método ampliamente utilizado para la búsqueda de genes específicos, sin embargo, aunque se usaron diferentes formas de marcaje en la búsqueda del cDNA completo de la CuZnSOD, no fué posible obtener la secuencia completa. Ya que esto pudo deberse al bajo nivel del mRNA de la CuZnSOD, lo cual se observó en diferentes tejidos de camarón, en estudios posteriores se podrán utilizar organismos en los que se haya inducido a su sistema antioxidante, y de esta manera asegurar la presencia del mensaje para esta enzima que es altamente inducible. Así, se podrá obtener al gen completo de la CuZnSOD además de corroborar la secuencia obtenida en este trabajo.

En cuanto a GST, se obtuvo la secuencia completa para esta enzima, donde se pudieron observar las características que comparte la GST de camarón con las de otros organismos.

En este trabajo también se detectó la expresión para CuZnSOD y GST en varios tejidos, pero no en todos los evaluados, por lo cual en estudios posteriores se podrá evaluar su nivel de expresión en condiciones que puedan inducir a su sistema antioxidante y estudiar si hay una inducción tejido específica, además de buscar los mecanismos específicos de inducción.

APÉNDICE

A continuación se muestran las secuencias de clones 61, 13 y 33, provenientes de la búsqueda en el banco de genes de hepatopáncreas de camarón blanco, así como su análisis por comparación con la base de datos del NCBI utilizando BLASTX. Se llama secuencia cruda a aquella que proviene directamente del proceso de secuenciación, y secuencia depurada a la que se ha procesado eliminando la secuencia correspondiente a vector.

Clon 61

1. Secuencia cruda (determinada con T3)

```
ANCTGGACTGGCGGCTGCAGGTCGACACTAGTGGATCCAAAGAAATTCGGCACGAGGCTACACCCCTGGGCGACCCCAACAACAACGAC
CTGCAAGGGCCATCAAAGCCCTGGGTGGGAGGGCGGAAATCCGGGGCCCTTACACGAAACGCCACGGGAACGCTGGCTTACTTGGAGATTTG
CAGCATGATGGTCCASGACTCGGCTTGGGTGGACCCGCTACGATGACCTCGGCCCTTGTTCCTTCACTCACAATGGTGACCAGTGGGTGG
GCTACGGAGGACCCGGCCAGCCCTCAAGATCAAGATSSACTACATCCGGGACATGGGCTTCCCTGGGGGCCATGACGTGGGCCATCGACCAG
GACGACTACAAGGAGTGGTGGGGCCAGGGGAAGAACCOCATGATGCAGACTATCTACGACGGGAATGAAGGACTACTACGTCCCGTGTTC
CACCATCAGAACCCCGGGACCCCAACGCCCCACGACCCACCAGGGACCCCAACGCCCCCAAGGACGACTCTCGGGCCCATGGACT
GCTCGGTGGCGGACTACTGGCCCAAGCCGACTGGGACAAGTACTACTGGTGTCTACGACGGCGTGGCCCAAGAGGAGGGGTGCCCGGCGG
GCCTGGTGTGGAAACCAAGCCGACCCACAACCTGCCACTGGGGGGCAACGTGGACACCTTCAACTGNAACATGGCCGTCCCTNGANCAGST
CCCCAACGGGTTCGAANGAAGANAAGCGAACTTCTTCCAACATGCCGTTCCCTTGACCGAGTCCCAACGGGTTCGAAGGAGGACAAAGGGAA
CTTCTTCCAAATTCGGCTNCTTGGACCGAATCCCAACGGGTCAAAGGAGGAANGACTTCTTCCAAATTTGTGTTTTAACAATTTGG
CCACGANABNAGACTCACACTTTTGGTTGGAAAGTGAAGGATNMAACAACCCGGTTATTTAAGGGCNAGGATNTCRNGCAAAAAATGT
TTTTCTGTGTCAAAAAAIAAAAAAACCCTTTTTTTTTCTTNAAAAAATTCCCAAATTAATAAAGGATNGTAAAAATAGGGANGGTTTTN
GGNTCCCTNGGGNTTAAACTTGNAAATCGAAAAAGTCCCTTCC
```

2. Secuencia depurada.

```
CGAGGCTACACCCCTGGGGGACCCCAACAACAACGACCTTGCACGGCGCCATCAAAGCGTGGGTGGGAGCCGGGAATCCGGGGCCCTTACAC
GAACGCCACGGGAACGCTCGCTTACTTGGAGATTTGCAGCAATGATGGTCCAGGACTCGGCTTGGGTTGGACCCCTACGATGACGTCCGGCC
TTGTTCCTTCACTCACAATGGTGAACAGTGGGTGGGCTACGAGGACCCGGCCAGCCCTCAAGATCAAGATGGACTACATCCGGGACATG
GGCTTCCCTGGGGCCATGACGTGGGCCATCGACCAAGACGACTACAAAGGAGTGGTGGGGCCAGGGGAAGAACCCCAATGATGCAGACTAT
CTACGACGGGAATGAAGGACTACTTGGTCCCGTGTCCACCATCAGGACCAACCCGGGACCCCAACGCCCCCAAGCAACCCACCCAGGGACC
CCAAAGCCCCCAGCAGACTCTGGGGCCCATGGACTGCTCGGTGGGGGACTACTGGCCCAAGCCGACTTGGACAADTACTACTTGGTGTCT
ACGACGGGCTTGGCCCAAGGAGGAGGGGTGCCCGCGGGCCCTCGTGTGGAACCAAAGCCGACCCACAACCTGGGACTGGGGGGGCAACGTGGA
CACCTTCAAATG
```

3. BLASTX

Query= (635 letters)
Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DBJ+PDB proteins
1,318,063 sequences; 422,011,944 total letters
Sequences producing significant alignments:

gi 1256180 dbj BAA12287.1 chitinase [Marzupenaeus japonicus]	69	2e-71
gi 5114426 gb AAD40313.1 AF157503_1 chitinase 1 [Penaeus monodon]	61	4e-69

gi 21296005 gb EAA06150.1	ebiD3069 (Anopheles gambiae str. PEST)	40	6e-35
gi 21350195 ref NP_650314.3	CG9307-PA (Drosophila melanogaster)	45	4e-34
gi 12082999 gb AA048700.1	AF326596_1 chitinase (Bombyx mandarina)	39	2e-32
gi 1841851 gb AAB47538.1	chitinase-like protein (Bombyx mori)	38	5e-32
gi 10119704 dbj BAB13481.1	chitinase precursor (Bombyx mori)	38	5e-32
gi 2564719 gb AAB81849.1	chitinase (Aedes aegypti)	38	7e-32
gi 11528083 gb AAG37105.1	AF273695_1 chitinase (Bombyx mori)	37	9e-32
gi 17981595 gb AAL51080.1	AF456139_1 chitinase precursor (Bombyx mori)	37	9e-32
gi 544013 sp P36362	CHIT_MANSE ENDOCHITINASE PRECURSOR >gi 10790	37	1e-31
gi 1841853 gb AAB47539.1	chitinase protein (Hyphantzia cunea)	37	1e-31
gi 11994959 dbj BAB20017.1	chitinase precursor (Bombyx mori)	35	4e-31
gi 9971609 dbj BAB12676.1	endochitinase (Spodoptera litura)	34	9e-31
gi 21913148 gb AAM43792.1	chitinase (Choristoneura fumiferana)	33	2e-30

>gi|1256180|dbj|BAA12207.1| chitinase (Marsupenaeus japonicus)
 Length = 572

Score = 269 bits (687), Expect = 2e-71

Identities = 129/225 (57%), Positives = 147/225 (65%), Gaps = 16/225 (7%)
 Frame = +1

Query: 1 RGYTLGDPNNNDLHAPIKAWVGGGNGPGPYTNATGTLAYFEICSMVVQDSAWVDRYDDVGL 180
 R YTLGDPNNNDLHAPIK W GCG PGPYTNATGT+AYFEIC MM +DS WVDRYDDVGL
 Sbjct: 292 RTYTLGDPNNNDLHAPIKKNWGGGKPGPYTNATGTMAVFEICLMMQEDSEWVDRYDDVGL 351

Query: 181 VPFTHNGDQWVGYEDPASLKIEMDYIRDMGFLGAMTWAIDQDDYKEWCCGQKRNPMQTIIY 360
 VPFTH GDQWVGYEDP SLKIKMD+IR+ G+LGAMTWAIDQDD+ WCG+GKRNPM TIIY
 Sbjct: 352 VPFTHNGDQWVGYEDPDSLKIKMDFIREQGYLGAMTWAIDQDDFRSWCGRGRNPMNTIIY 411

Query: 361 DGMKDYVVPV-----STITTTTRDPNAPSXXXXXXXXXXXXXIGPMDCSVA 492
 +GMKDY VPV +T TTTTRDP+ + +GP+DC+V
 Sbjct: 412 DGMKDYVVPVAPFLPPTTTTPHWTPPTTTTTRDPSI-TTTTRDPNLPITTTMSPIDCTVQ 470

Query: 493 DYWXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXSCGTRPTHNCDWAGNVDT 627
 +YW + + CDW NVDT
 Sbjct: 471 EYWPHPDCKRYWCFEGEPHLEYCFAGTVVWQAIKACDWPANVDT 515

>gi|5114426|gb|AAD40313.1|AF157563_1 chitinase 1 (Penaeus monodon)
 Length = 620

Score = 261 bits (668), Expect = 4e-69

Identities = 126/225 (56%), Positives = 144/225 (64%), Gaps = 16/225 (7%)
 Frame = +1

Query: 1 RGYTLGDPNNNDLHAPIKAWVGGGNGPGPYTNATGTLAYFEICSMVVQDSAWVDRYDDVGL 180
 R YTLGDP NN LHAPIK W GCG PGPYTNATGT+AYFEIC MM +DS WVDRYDDVGL
 Sbjct: 292 RTYTLGDPNNNDLHAPIKKNWGGGKPGPYTNATGTMAVFEICLMMKEDSEWVDRYDDVGL 351

Query: 181 VPFTHNGDQWVGYEDPASLKIEMDYIRDMGFLGAMTWAIDQDDYKEWCCGQKRNPMQTIIY 360
 VPFTH GDQWVGYEDP SLKIKMD+IR+ G+LGAMTWAIDQDD+ WCG+G +PM TIIY
 Sbjct: 352 VPFTHNGDQWVGYEDPDSLKIKMDFIREQGYLGAMTWAIDQDDFRSWCGRGRNPMNTIIY 411

Query: 361 DGMKDYVVPV-----STITTTTRDPNAPSXXXXXXXXXXXXXIGPMDCSVA 492
 DGMKDY VPV +T TTTTRDP+ + +GP+DC+V
 Sbjct: 412 DGMKDYVVPVAPFLPPTTTSPWVTPPTTTTTRDPSI-TTTTRDPNLPITTTMSPIDCTVQ 470

Query: 493 DYWXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXSCGTRPTHNCDWAGNVDT 627
 +YW + + CDW NVDT
 Sbjct: 471 EYWPHPDCKRYWCFEGEPHLEYCFAGTVVWQAIKACDWPANVDT 515

Clon 13

1. Secuencia cruda (determinada con oligonucleótido T7)

```

GNNTNGTMAACGNCACTTACCTGGTACCCECCCGGGTGGAAAAATCGATGGCCCCGGGGCCGCTCTAGAAGTACTCTCGAGTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTAAAGAAAAATTCCTTATTTAAAAACATTCCTCTTCAGTGTTTACAAAAACTGCMAAACAAACATGAGCTGGGAT
TAGCAAAGGACATATAGGTATACACTCAAATTTGTGAGTGATTTGTGGAGCAATGATGTAATCTCATCGTCCGTCATCGGCCAAGACATTTG
ACTTGAGGTGCCTCCACTGGCTGGTCCCTTCAGCAGCTGTGTTCATCTTGTAAAGCCGCTTGGCCGTTTTGCTAGCTTCTTACTCTTTCCAGT
ACCTATTTCTCTGTGTACCAATGGTGCATGCAATGGAGAAAGTTCGGTTCATGGAGGAAGCCCTCCTCTGAGGTAAAGTTCATATGTGG
GAGGGGGCCCATCNACGCCCCCATGCACAGCTTCTGCAAGGACCCACTGGGTTCCCTGGGATACCATCATCATATGGGGAAACAAATCTG
GGTGTATAGTTCTGGTGGAGCTCCANGAGCTCCGCCCTGAAGTGGGTCCCCCAACCCCTGCAGCACCCACCCCTGGATGATGATGTCCAAAG
CAAGCCCTTGC AAC TGGCTGTTTTGNCCTTTCTTTTGTCTTGNCCAAAANCCATTGGTGCMAACTCCCCACAGGGNCTNTNTNCAAAA
AGTTGGGTTCATGAACCCCTTCCNTATNTGCAAGAANGGCATACTTGGGGAAAAATTCCTTTGGGCTACCACAACNTNTGGGAAAAANT
GAAAANAGGGTTTTGGGANGGNAANAACCTCCGACATGCCCTTAAACATTTGGTTANANGGAATCCCTTTGGGNGGGGGTGTGGAT
NCTGATTTCCACCTAATNGGTTGNCGGGAANCGGCCCAAAAANGGATTTNATNATGGAACTTTCCCTGGATTAANACCNAAGGNNCCC
NGTCCCCCGGGSHNGGCTCCNAAAAANAATGGGGAACTTCCCCCTTTGCHNCTTTTTGGANAGCCNCCCCCCCC

```

2. Secuencia depurada.

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGAAAAATTCCTTATTTAAAAACATTCCTCTTCAGTGTTTACAAAAACTGCMAAACAAACATGAG
GCTGGGATTTAGCAAAGGACATATAGGTATACACTCAAATTTGTGAGTGATTTGTGGAGCAATGATGTAATCTCATCGTCCGTCATCGGCC
AAGACATTTGACTTGGGTGCCTCCACTGGCTGGTCCCTTCAGCAGCTGTGTTCATCTTGTAAAGCCGCTTGGCCGTTTTGCTAGCTTCTTACT
CTTCCAGTACCTATTTCTCTGTGTACCAATGGTGCATGCAATGGAGAAAGTTCGGTTCATGGAGGAAGCCCTCCTCTGAGGTAAAGCT
CATATGTGGGAGGGGGCCATCNACGCCCCCATGCACAGCTTCTGCAAGGACCCACTGGGTTCCCTGGGATACCATCATCATATGGGGA
AACAAATCTGGGTTGATAGTTCTGGTGGAGCTCCANGAGCTCCGCCCTGAAGTGGGTCCCCCAACCCCTGCAGCACCCACCCCTGGATGATGA
TGCCAAAGACAAGCCCTTGCMAACTGGGTGTTTTGNCCTTTCTTTTGTCTTGNCCAAAANCCATTGGTGCMAACTCCCCACAGGGNCTNT
GNCACRAAAGTTGGGTTCATGAACCCCTTCCNTATNTGCAAGAANGGCATACTTGGGGAAAAATTCCTTTGGGCTACCACAACNTNT
GGGAAAAANTGAAAAANAGGGTTTTGGGANGGNAANAACCTCCGACATGCCCTTAAACATTTGGTTANANGGAATCCCTTTGGGNGGGGG
GTGNTGGATNCTGATTTCCACCTAATNGGTTGNCGGGAANCGGCCCAAAAANGGATTTNATNATGGAACTTTCCCTGGATTAANACCNA
AAGGNNCCCNSTCCCCNGCGGGNNGGCTCCNAAAAANAATGGGGAACTTCCCCCTTTGCHNCTTTTTGGANAGCCNCCCCCCCC
T

```

3. BLASTX

Query= (980 letters)
 Database: Swissprot proteins
 119,606 sequences, 43,669,827 total letters

Sequences producing significant alignments:

gi 3334380 sp Q15633 TRBP_HUMAN TAR RNA-binding protein 2 ...	69	8e-11
gi 3324379 sp P97473 TRBP_MOUSE TAR RNA-binding protein 2 (a...	68	8e-11
gi 3334381 sp Q91836 TRBP_XENLA Double stranded RNA binding ...	60	8e-11
gi 339909 gb AAA36765.1 TAR RNA binding protein	69	8e-11
gi 19743838 ref NP_004169.3 TAR RNA binding protein 2 isoform...	69	8e-11
gi 107904 pir A38430 trans-activation-responsive RNA-bindin...	69	8e-11
gi 3334380 sp Q15633 TRBP_HUMAN TAR RNA-binding protein 2 (...	69	8e-11
gi 7412848 gb AA850581.2 TAR RNA binding protein 2 (Homo s...	69	6e-11
gi 19743840 ref NP_599150.1 TAR RNA binding protein 2 isoform...	69	6e-11
gi 6678221 ref NP_033345.1 TAR (HIV) RNA binding protein 2...	68	2e-10
gi 12805141 gb AA802028.1 Similar to TAR (HIV) RNA binding...	68	2e-10
gi 27700607 ref XP_230047.1 similar to protein kinase, int...	52	2e-08
gi 5755162 ref NP_036001.1 protein kinase, interferon indu...	52	2e-08
gi 4505581 ref NP_003661.1 protein kinase, interferon-indu...	52	3e-08
gi 21739361 emb CKD38735.1 hypothetical protein (Homo sapi...	52	3e-08
gi 3334381 sp Q91836 TRBP_XENLA Double stranded RNA binding...	60	6e-08
gi 27696370 gb AA843873.1 Unknown (protein for MGC153736) ...	60	6e-08
gi 12849779 dbj BAB28477.1 unnamed protein product (Mus mu...	50	9e-08
gi 19526444 gb AA889718.1 AF483620_1 RNA-binding protein at...	47	5e-07
gi 19745196 ref NP_604461.1 staufen, RNA binding protein, ...	47	5e-07

>gi|3334380|sp|Q15633|TRBP_HUMAN TAR RNA-binding protein 2 (Trans-activation responsive RNA-binding protein)
Length = 366

Score = 69.3 bits (168), Expect = 1e-11
Identities = 38/102 (37%), Positives = 54/102 (52%)
Frame = -3

Query: 459 QPRLFPHMMVSGQNI'VGPGRSCARRRXWPPPTYELTSEEGFPHERTFESIACTIGNTREI 280
QP + P S+ NPVG + ++ W P Y +T E G H + F++ C + EI
Sbjct: 148 QPPVSPQQ---SECNPVGALQELVVGKGRLEPYTVTQESGPAHRKEFTMTCRVERFIEI 204

Query: 279 GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKDQPVVEAPQVNVLADEDDDEIT 154
G+G SKKLAKR AA KM + P++A N + DDD +
Sbjct: 205 GSGTSSKKLAKRNAAAKMLLRVHTVFLDARDGNEVEEDDDHPS 246

Score = 43.9 bits (102), Expect = 5e-04
Identities = 36/99 (36%), Positives = 47/99 (47%), Gaps = 2/99 (2%)
Frame = -3

Query: 366 PTYELTSEEGFPHERTFESIACTIGNTREI'GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKDQPVVEAPQV 187
P Y+L EG H+ F+ T+G+T G G SKK AK +AA + LK + P
Sbjct: 46 PVDLLKAEQQAHPNPFYFRVTVGDTSC'GTGSKKAAKHAEEVALKHLKGGSMLEP~ 103

Query: 186 NVLADEDDDEITSLLDKSL--TI'VYTYMSFAKSQLIVVL 76
A +D S LD SL] V+T + A VVL
Sbjct: 104 --ALEDSSESFLDSSLPEEIPVPTAAAATPVPSVVL 139

gi|3334379|sp|P97473|TRBP_MOUSE TAR RNA-binding protein 2 (Protamine-1 RNA binding protein) (PKM-1)
RNA binding protein)
Length = 365

Score = 68.2 bits (165), Expect = 2e-11
Identities = 38/102 (37%), Positives = 53/102 (51%)
Frame = -3

Query: 459 QPRLFPHMMVSGQNFVGPGRSCARRRXWPPPTYELTSEEGFPHERTFESIACTIGNTREI 280
QP + P S+ NPVG + ++ W P Y +T E G H + F++ C + EI
Sbjct: 147 QPPVSPQQ---SECNPVGALQELVVGKGRLEPYMVTQESGPAHRKEFTMTCRVERFIEI 203

Query: 279 GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKDQPVVEAPQVNVLADEDDDEIT 154
G+G SKKLAKR AA KM + P++A N DDD +
Sbjct: 204 GSGTSSKKLAKRNAAAKMLLRVHTVFLDARDGNEAEPDDDDHPS 245

Score = 49.7 bits (117), Expect = 8e-06
Identities = 31/77 (40%), Positives = 40/77 (51%)
Frame = -3

Query: 366 PTYELTSEEGFPHERTFESIACTIGNTREI'GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKDQPVVEAPQV 187
P Y+L EEG H+ P+ T+G+T GTG SKK AK +AA + LK + P
Sbjct: 46 PVDLLKESGQAHPNPFYFRVTVGDTSC'GTGSKKAAKHAEEVALKHLKGGSMLEP-- 103

Query: 186 NVLADEDDDEITSLLDKS 116
A +D SLLD S
Sbjct: 104 --ALEDSSESLLDSS 117

>gi|3334380|sp|Q15633|TRBP_HUMAN TAR RNA-binding protein 2 (Trans-activation responsive RNA-binding protein)
Length = 366

Score = 69.3 bits (160), Expect = 1e-11
 Identities = 30/102 (37%), Positives = 54/102 (52%)
 Frame = -3

Query: 459 QPRLFPHMMVSGNPFVGPGRSCAWRRXWPPPTYELTSEEGFPHERTFSLACTIGNTREI 280
 QP + P S+ NPVG + ++ W P Y +T E G H + F++ C + EI
 Sbjct: 148 QPVSPOQ---SECNPVGAHQELVVQKGNRLPEYTVTQESGPAHRKKEFTMTCRVERFIEI 204

Query: 279 GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKQDPVEAPQVNVLADEDDDEIT 154
 G+G SKKLAKR AA KM + P++A N + DDD +
 Sbjct: 205 GSGTSSKLAKRNAAKMLLRVHTVPLDARDGNEVEPEDDDHFS 246

Score = 43.9 bits (102), Expect = 5e-04
 Identities = 35/99 (36%), Positives = 47/99 (47%), Gaps = 2/99 (2%)
 Frame = -3

Query: 366 PTYELTSEEGFPHERTFSLACTIGNTREIGTGRSKQLAKRQAAYKMTQLLKQDPVEAPQV 187
 P Y+L EG H+ F+ T+G+T G G SKK AK +AA + LK + P
 Sbjct: 46 PVYDLLKAEQAHQPNFTFRVTVGDTSCVTGQSGKKAARKKAAEVALKHLKGGEMLEP-- 103

Query: 186 NVLADEDDDEITSLDKSL--TI*VYTYMFAKQQLIVVL 76
 A +D S LD SL I V+T + A VVL
 Sbjct: 104 --ALEDESSSPSLDSSLEEDIPVFTAAAAATPVPSVVL 139

gi|3334379|sp|P97473|TRBP_MOUSE TAR RNA-binding protein 2 (Protamine-1 RNA binding protein) (P97473)
 RNA binding protein
 Length = 365

Score = 68.2 bits (165), Expect = 2e-11
 Identities = 30/102 (37%), Positives = 53/102 (51%)
 Frame = -3

Query: 459 QPRLFPHMMVSGNPFVGPGRSCAWRRXWPPPTYELTSEEGFPHERTFSLACTIGNTREI 280
 QP + P S+ NPVG + ++ W P Y +T E G H + F++ C + EI
 Sbjct: 147 QPVSPOQ---SECNPVGAHQELVVQKGNRLPEYTVTQESGPAHRKKEFTMTCRVERFIEI 203

Query: 279 GTGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKQDPVEAPQVNVLADEDDDEIT 154
 G+G SKKLAKR AA KM + P++A N DDD +
 Sbjct: 204 GSGTSSKLAKRNAAKMLLRVHTVPLDARDGNEARPDHDFG 245

Score = 49.7 bits (117), Expect = 8e-06
 Identities = 31/77 (40%), Positives = 40/77 (51%)
 Frame = -3

Query: 366 PTYELTSEEGFPHERTFSLACTIGNTREIGTGRSKKLAKRQAAYKMTQLLKQDPVEAPQV 187
 P Y+L EEG H+ F+ T+G+T GTG SKK AK +AA + LK + P
 Sbjct: 46 PVYDLLKAEQAHQPNFTFRVTVGDTSCVTGQSGKKAARKKAAEVALKHLKGGEMLEP-- 103

Query: 186 NVLADEDDDEITSLDKS 136
 A +D SLD S
 Sbjct: 104 --ALEDESSLSLSS 117

Clon 33

1. Secuencia cruda (determinada con oligonucleótido M13 Rv)

```
GGNNHRACGCACCTCAGAATTAACCCCTACTAAAGGGACTAGTCCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTTGCATGTCACAGGGGCCCCAC
TTCAATCGAATGACAGCATAACCTTCCACCAGCAGATCATAGTTATATAGAAATTCCTTAAATCACTAAT/AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AACACTGCTTTGCCGNTNEGTAACCGTATNGNTGACAGCAAGGGCGAATTCGNGGCGGCTNAATTNAATTNGCCCGCGNTGCGTACCGT
ATNGNTGACAGCAAGGGCGAATTCGNGGCGGCTNAATTNAATTNGCCCTATNNNGASTNGTATTAACAATTNACTGGCCGTCGNTTTACA
ACGANGGGACTTGGAAAACCCCTGCCGNTACCCAACCTAATCGCCCTTGCANNACATNCCCTTTCNNCAGCTGGCGNAATANGGAAGAGG
CCCGCACCGGATCGCCCTTCCNNAACANNTGGCAGCCCTATACNTACGGCAGHTTAAGGTTTACACCTATNAAGAGAGAGAGCCGNTNTCGT
CTGTTTGTGGATGTACAGANTGATATTAATGACACGCGCGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTATGNTGCAGATAAA
GNNNTCCGTGAACCTTAAACCGGGGGGCATATNGNGGATGAAAGNTGGCNCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGGCCGGNCTCCGTTA
TCGNGGAAGAAAGTGGSTTGATTTNANCACCGCGAAAATGACTTCAAAAACGCCNTTNACTTGATGNTTGGGGAATATAAATGCAGGC
ATGAGATTA/CAAAAAGGATCTTTACCTANATCC/TTTTNACGTAAAAGNCAGCCCGCAAAAACNGNGTGGCCCGGATGAATGAAGCTA
CTGGCTATCTGGACAAGGAAACCAAGCCCNACAAAAAAGAGAGCTTGCANNGGGCTTACTTGNCGGTGGTAANCTGGCCGGGTTT
TTGACGGCAGCNANCCGCANTTGGCNCYGGGNGCCCTTTTANGTGGGAAGCCCCCAAAAAANTGATGGGTTT/TTTCCCAGGATT
TNTGGNCGCAGGATAACTTTTCAAAAAANAGATGGGATNNTTTWTN
```

2. Secuencia depurada

```
GGNNNAACGCACCTCAGAATTAACCCCTACTAAAGGGACTAGTCCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTTGCATGTCACAGGGGCCCCAC
TTCAATCGAATGACAGCATAACCTTCCACCAGCAGATCATAGTTATATAGAAATTCCTTAAATCACTAAT/AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AACACTGCTTTGCCGNTNEGTAACCGTATNGNTGACAGCAAGGGCGAATTCGNGGCGGCTNAATTNAATTNGCCCGCGNTGCGTACCGT
```

3. BLASTX

Query=(228 letters)
 Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DBJ+PDB proteins
 1,318,063 sequences; 422,011,944 total letters

Sequences producing significant alignments:

gi 15076849 gb AAK82961.1	cytochrome c oxidase subunit I [Fenne...	52	2e-06
gi 13924505 gb AAK49034.1	cytochrome oxidase subunit I [Fennero...	52	2e-06
gi 4582670 emb CA940364.1	cytochrome c oxidase subunit I [Farfa...	52	2e-06
gi 21666426 gb AAK73703.1	AF395115_1 cytochrome oxidase subunit ...	52	2e-06
gi 15076877 gb AAK82975.1	cytochrome c oxidase subunit I [Fenne...	52	2e-06
gi 7374116 ref NP_038289.1	COX1_15276 cytochrome c oxidase subun...	52	2e-06
gi 15076879 gb AAK82976.1	cytochrome c oxidase subunit I [Fenne...	49	1e-05
gi 16566467 gb AAL26520.1	AF425362_2 cytochrome oxidase subunit ...	47	9e-05
gi 20257527 gb AAK15927.1	cytochrome oxidase subunit I [Hemari...	46	1e-04
gi 18496844 gb AAL74260.1	AF466700_1 cytochrome c oxidase subunl...	45	3e-04
gi 7542362 gb AAF63420.1	AF150756_2 cytochrome oxidase subunit 1...	44	4e-04
gi 15193449 ref NP_150616.2	cytochrome c oxidase subunit I [Pag...	44	4e-04
gi 16923820 gb AAL31587.1	AF437625_1 cytochrome oxidase subunit ...	44	8e-04
gi 16923831 gb AAL31594.1	AF437629_1 cytochrome oxidase subunit ...	44	8e-04

>gi|15076849|gb|AAK82961.1| cytochrome c oxidase subunit I [Fenneropenaeus chinensis]
 Length = 279

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
 Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
 Frame = +1

Query: 85 PTSIE*QHNLPPADHSYIEIPLITN 159
 PTSIE QHNLPPADHSY+EIPLITN
 Sbjct: 255 PTSIENQHNLPPADHSYMEIPLITN 279

```

>gi|13924505|gb|AAK49034.1| cytochrome oxidase subunit I [Fenneropenaeus chinensis]
gi|15076847|gb|AAK82960.1| cytochrome c oxidase subunit I [Fenneropenaeus chinensis]
gi|15076851|gb|AAK82962.1| cytochrome c oxidase subunit I [Fenneropenaeus chinensis]
Length = 279

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 255 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 279

>gi|4582670|emb|CAB40364.1| cytochrome c oxidase subunit 1 [Parfantepenaeus notialis]
Length = 513

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 489 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 513

>gi|21666426|gb|AAM73703.1|AF396115_1 cytochrome oxidase subunit I [Fenneropenaeus sp.
RCCP-2002]
Length = 520

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 495 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 519

>gi|15076877|gb|AAK82975.1| cytochrome c oxidase subunit I [Fenneropenaeus indicus]
Length = 520

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 495 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 519

>gi|7374116|ref|NF_038289.1|COX1_15276 cytochrome c oxidase subunit I [Penaeus monodon]
gi|7243613|gb|AAF43374.1|AF217843_3 cytochrome c oxidase subunit 1 [Penaeus monodon]
Length = 512

Score = 52.0 bits (123), Expect = 2e-06
Identities = 23/25 (92%), Positives = 24/25 (96%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 487 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 511

>gi|15076879|gb|AAK82976.1| cytochrome c oxidase subunit I [Fenneropenaeus merguensis]
Length = 520

Score = 49.3 bits (116), Expect = 1e-05
Identities = 22/25 (88%), Positives = 23/25 (92%)
Frame = +1

Query: 85  P T S I E * Q H N L P P A D H S Y I E I P L I T N 159
          P T S I E Q H N L P P A D H S Y + E I P L I T N
Sbjct: 495 P T S I E W Q H N L P P A D H S Y M E I P L I T N 519

```

BIBLIOGRAFÍA

- Amstad, P., Peskin, A., Shah, G., Mirault, M. E., Moret, R., Zbinden, I. & Cerutti, P. (1991). The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* **30**, 9305-9313.
- Altschul, S.F., Gish, G., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Astley, K. N., Meigh, H. C., Glegg, G. A., Braven, J. & Depledge, M. H. (1999). Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin* **39**, 145-154.
- Banks, G. K., Robinson, A. S., Kwiatowski, J., Ayala, F. J., Scott, M. J. & Kriticos, D. (1995). A second superoxide dismutase gene in the medfly *Ceratitis capitata*. *Genetics* **140**, 697-702.
- Barillas-Mury, C., Han, Y. S., Seeley, D. & Kafatos, F. C. (1999). *Anopheles gambiae* Ag-STS, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *The EMBO Journal* **18**, 959-967.
- Bell, K. L. & Smith, V. (1993). *In vitro* superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental and Comparative Immunology* **17**, 211-219.
- Brouwer, M., Brouwer, T. H., Grater, W., Enghild, J. J. & Thøgersen, I. B. (1997). The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochemistry* **36**, 13381-13388.
- Campa-Cordova, A. I., Hernandez-Saavedra, N. Y., De Philippis, R. & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polyssacharide. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 353-366.

- Choi, J., Roche, H. & Caquet, T. (1999). Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae – a potential biomarker. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124C**, 73-81.
- Dandapat, J., Chainy, G. B. N. & Janardhana Rao (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **127C**, 101-115.
- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review of Genetic* **25**, 315-337.
- Denison, M. S. & Whitlock, J. P. Jr. (1995). Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, 18175-18178.
- Dickinson, D. A. & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* **64**, 1019-1026.
- Dos Santos, W. G., Pacheco, I., Liu, M., Teixeira, M., Xavier, A. V. & Le Gall, J. (2000). Purification and characterization of iron superoxide dismutase and catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Journal of Bacteriology* **182(3)**, 796-804.
- Eaton, D.L. & Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferase and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences* **49**, 156-164.
- Felipe-Ortega, F. X. (2000). Caracterización de secuencias nucleotídicas parciales (ESTs, STSs) de genes del camarón blanco *Penaeus vannamei*, obtenidos con oligonucleótidos para CP-VHDL. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Gowland, B. T. G., Moffat, C. F., Stagg, R. N., Houlihan, D. F. & Davies, I. M. (2002). Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research*. **54**, 169-77.
- Henkle-Duhrsen K, Tawe W, Warnecke C, Walter R. (1995). Characterization of the manganese superoxide dismutase cDNA and gene from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Biochemistry Journal* **308**, 441-446.

- Henson, K. L., Sheehy, K. M. & Gallagher, E. P. (2000). Conservation of a glutathione S-transferase in marine and freshwater fish. *Marine Environmental Research* **50**, 17-21.
- Hernández-Saavedra, N. Y. (1997). Caracterización de la enzima superóxido dismutasa tipo cobre-zinc de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, y clonación de la secuencia que la codifica a partir de ADNc. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz Baja California, México.
- Hernández-Saavedra, N. Y. & Romero-Geraldo, R. (2001). Cloning and sequencing the genomic encoding region of copper-zinc superoxide dismutase enzyme from several marine strains of the genus *Debaryomyces* (Lodder & Kreger-van Rij). *Yeast* **18**, 1227-1238.
- Higgins, D. G., Bleasby, A. J. & Fuchs, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **8**, 189-191.
- Hjalmarsson, K., Marklund, S. L., Engstrom, A. & Edlund, T. (1994). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. **84**, 6340-6344.
- Holmblad, T. & Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* **172**, 111-123.
- <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate>
- <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/options/clustalw.html>
- <http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicezyme.pl?2.5.1.18>
- <http://www.ncbi.nlm.gov/blast>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bp/primer/primer3.cgi>
- http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe
- Hunter, T., Bannister, W. & Hunter, G. J. (1997). Cloning, expression and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 28652-28659.

- Hwang, C. H. S., Rhee, G., Kim, S. T., Kim, Y. R., Huh, W. K., Baek, Y. U. & Kang, S. O. (1999). Copper and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1427**, 245-255.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. & Sninsky, J.J. (1990). PCR Applications. Protocols for Functional Genomics. Academic Press, Orlando Florida, EUA.
- Jakobsson, P. J., Mancini, J. A., Riendau, D. & Ford-Hutchinson, A. W. (1997). Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependant transferase and peroxidase activities. *The Journal of Biological Chemistry* **36**, 22934-22929.
- Jakoby, W. B. & Ziegler, D. M. (1990). The enzymes of detoxication. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 20715-20718.
- Johansson, M. W., Holmblad, T., Thörnqvist, P., Cammarata, M., Parrinello, N. & Söderhäll, K. (1999). A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *Journal of Cell Science* **112**, 917-925.
- Johansson, M. W. (1999). Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Developmental & Comparative Immunology*. **23**, 303-315.
- Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Yokoyama, H., Masumura, T. & Tanaka, K. (1999). Molecular cloning and characterization of cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* **63**, 302-308.
- Ketterman, A. J., Prommeenate, P., Boonchaay, CH., Chanama U., Leetachewa, S., Promtet, N. & Prapanthadara, I. (2001). Single aminoacid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 65-74.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A., Boukouvala, E. & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 313-319.
- Lin, Z. & Floros, J. (2000). Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. *BioTechniques* **29**, 466-468.

- Lin, CH. T., Yeh, K. W., Kao, M. CH. & Shaw, J. F. (1993). Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. *Plant Molecular Biology* **23**, 911-913.
- Lu, Y., Roe, J. A. & Bender, C. J. (1996). New type 2 copper-cisteinate proteins. Copper site histidine-to-cysteine mutants of yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Inorganic Chemistry* **35**, 692-700.
- Mathews, C., K. & Van Holde, K. E. (1990). *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Company Inc. Redwood City, CA. EUA. 516, 548-551, 746-747.
- Miao, Z. & Gaynor, J. J. (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Molecular Biology* **23**, 267-277.
- Mourente, G. & Diaz-Salvago, E. (1999). Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124B**, 405-416.
- Ocean Garden. (1991). Comportamiento del mercado del camarón. *Boletín* **8**, 1-12.
- Padilla-Sánchez, M. (1999). Fragmentos de los genes mitocondriales de rRNA de los camarones *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora, México.
- Ranson, H., Cornel, A. J., Fournier, D., Vaughan, A., Collins, F. H. & Hemingway, J. (1997). Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 5464-5468.
- Rhie, G., Hwang, C. S., Brady, M. J., Kim, S.T., Kim, Y. R., Huh, W. K., Baek, Y. U., Lee, B. H, Lee, J. S. & Kang S. O. (1999). Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 409-419.
- Rosa De Lima, M. F., Sánchez Ferreira, C. A., De Freitas, J. , Valenzuela, J. G. & Masuda, A. (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus*

- microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 747-754.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5436-5467.
- Sellos, D., Lemoine, S. & Van Wormhoudt, A. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters* **407**, 153-158.
- Seto, N. O., Hayashi, S. & Tener, G. M. (1989). Cloning, sequence analysis and chromosomal localization of the Cu-Zn superoxide dismutase gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene* **75**, 85-92.
- Shin, S. W., Park, S.S., Park, D. S., Kim, M. G., Kim, S. C., Brey, P.T., Park & H. Y. (1998). Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 827-837.
- Strohmeier, A. & Inlay, J. A. (1998). Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *Journal of Bacteriology* **180**, 1402-1410.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, NY, EUA. 568-569, 731, 743-747.
- Sun, T. & Morgenstern, R. (1997). Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochemistry Journal* **326**, 193-196
- Tavares-Sánchez, O. L. (2001). Aislamiento, caracterización y expresión del cDNA de catalasa de camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora. México.
- Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D. & Henkle-Dührsen, K. (1998). Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucleic Acids Research* **26**, 1621-1627.
- Vuilleumier, S. (1997). Bacterial glutathione S-transferases: What are they good for?. *Journal of Bacteriology* **179**, 1431-1441.

- Yepiz-Plascencia, G. M., Ho, CH., Martel, R. R. & Law, J. H. (1993). Molecular cloning and sequence of a novel ommochrome-binding protein cDNA from an insect, *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 2337-2340.
- Yepiz-Plascencia, G. (2000). Manual de prácticas. Técnicas Básicas de Biología Molecular. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Yu, X. Q, & Kanost, M. R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 37373-37381.