

**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A. C.**

*CARACTERIZACIÓN DEL cDNA Y EXPRESIÓN DEL  
GEN DE LA HDL-BGBP DEL CAMARÓN BLANCO  
*Penaeus (Litopenaeus) vannamei**

POR

**MARÍA GABRIELA ROMO FIGUEROA**

TESIS APROBADA POR LA

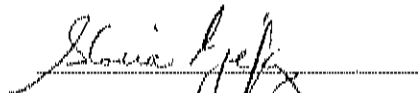
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE  
ORIGEN ANIMAL

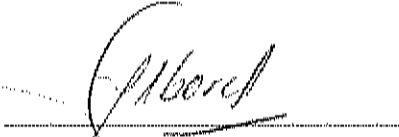
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

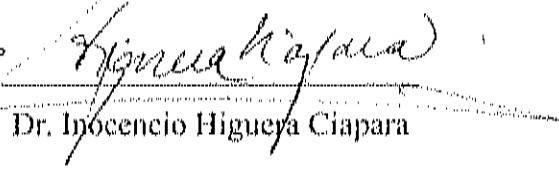
**DOCTORADO EN CIENCIAS**

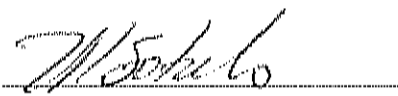
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q. B. María Gabriela Romo Figueroa, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de Doctorado en Ciencias de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

  
Dra. Gloria Yepiz Plascencia  
Directora de Tesis

  
Dr. Francisco Vargas Albores

  
Dr. Inocencio Higuera Ciapara

  
Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo

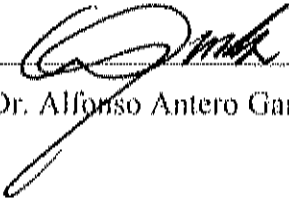
  
Dr. Fernando L. García Carreño

## DECLARACIÓN 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), Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

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 Antero Gardea Béjar

Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., en especial a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Coordinación de Docencia, Dirección General y Dirección Administrativa, con cariño a todo el personal del CIAD.,

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca de doctorado para realizar mis estudios (110328).

Este trabajo de tesis fue realizado con el financiamiento de CONACyT para los proyectos: 0564P-N9506, 29091B y 36926 y por la International Foundation for Science (IFS) proyecto A/2500-1.

A la Dra. Gloria Yepiz-Plascencia, por darme alas para realizar este precioso trabajo de tesis. Gracias por sus enseñanzas y por dejarme crecer.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Francisco Vargas-Albores, Dr. Inocencio Higuera-Ciapara, Dr. John H. Law y Dr. Kenneth Söderhäll por su valiosa contribución a este trabajo. Un especial agradecimiento al Dr. Rogerio Sotelo-Mundo y al Dr. Fernando García-Carreño por su gran apoyo en el examen final.

A los Doctores María Auxiliadora Islas y Rogerio Sotelo-Mundo, por su apoyo incondicional, sin sus frases de aliento no lo hubiera logrado.

A los miembros del laboratorio de Biotecnología Marina y Biología Molecular de Organismos Acuáticos con los que compartí momentos gratos, en especial a Ximena Felipe-Ortega Fonseca por su valiosa amistad a su lado nunca me sentí sola, a Jorge Hernández y a Enrique Villalpando, por su apoyo en la obtención de las muestras para

este trabajo y por su cariño. Los llevaré siempre en mi corazón. También agradezco la paciencia que me tuvieron Gilberto, Enriquito y Carmen al enseñarles lo que aprendí. Con cariño a Azucena,

Con especial cariño a mis amigos Ciria, Choco, Elísa, Ana y Roberto su amistad me fortaleció el Alma, Esto logro se los debo a Ustedes.

## DEDICATORIA

*A Dios, por que está conmigo*

*A mi Madre, por su gran fortaleza de espíritu.*

*A Martín y Annette, por su amor y paciencia.*

*Con todo mi amor*

*María Gabriela*

## CONTENIDO

	Pág
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Lípidos en la Dieta de Crustáceos.....	3
Lipoproteínas de Transporte.....	4
Lipoproteína de Alta Densidad (HDL) de <i>P. vannamei</i> .....	5
Lipoproteína de Muy Alta Densidad (VHDL) de <i>P. vannamei</i> .....	6
Lipoproteínas y el Sistema de Defensa.....	7
Genes de Lipoproteínas.....	10
Genes de Lipoproteínas de Insectos.....	10
ApoLp-III de <i>M. sexta</i> .....	10
ApoLp-I y ApoLp-II de <i>M. sexta</i> ApoLp-I y ApoLp-II de <i>M. sexta</i> .....	11
ApoLp III/I de <i>L. migratoria</i> .....	12
ApoLp-III de <i>G. mellonella</i> .....	12
ApoLp-III de <i>B. mori</i> y <i>B. mandarina</i> .....	13
Genes de lipoproteínas de Crustáceos.....	14
BGBP de <i>P. leniusculus</i> .....	14
CP de <i>P. leniusculus</i> .....	15
CP de <i>P. monodon</i> .....	15
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	18
Materiales y Reactivos.....	18
Animales.....	18
Diseño de Oligonucleótidos Específicos para HDL.....	18
Búsqueda en la Genoteca de cDNA de Hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i> .....	21
Análisis de Secuencia de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos.....	25
Northern y RNA blot.....	26
Análisis de Expresión del mRNA de la HDL-BGBP por Transcripción Reversa-PCR (RT-PCR).....	29
Extensión del Primer 5' (Primer Extension).....	31

Contenido (continuación)

DNA Genómico vs cDNA.....	33
RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
Búsqueda de Clones de HDL-BGBP en el Banco de Genes de cDNA de Hepatopáncreas.....	35
Análisis de Secuencia de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos de HDL-BGBP de Camarón Blanco.....	39
Caracterización Nucleotídica del cDNA de HDL-BGBP.....	39
Caracterización de la Secuencia Deducida de Aminoácidos de HDL- BGBP.....	45
Predicción de la Estructura Secundaria de la HDL- BGBP.....	54
Tamaño y Expresión del Mensaje de HDL-BGBP.....	69
Northern blot.....	69
Extensión del Primer de la Región 5'.....	69
Expresión del mRNA de la HDL-BGBP.....	71
RNA blot.....	71
RT-PCR.....	75
Estructura del Gene de HDL-BGBP.....	78
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	83



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Condiciones para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleotidos específicos de HDL-BGBP.....	20
2	Combinación de primers y tipo de templado utilizados en la búsqueda de intrones en el gene que codifica HDL-BGBP de camarón blanco. Tamaño del fragmento esperado expresado en pares de bases (pb) según la longitud obtenida del cDNA.....	34
3	Clones potenciales de HDL-BGBP del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas de camarón blanco.....	38
4	Calidad, concentración y rendimiento del RNA total de diferentes tejidos del camarón blanco.....	73
5	Densitometría expresada como intensidad neta (pxl).....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación de PCR potenciales para HDL-BGBP.....	36
2	Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de los productos de digestión doble <i>EcoRI/XhoI</i> de los clones potenciales del banco de genes de hepatopáncreas.....	40
3	Esquema de barras del cDNA de la HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> , mapa de restricción y alineamiento de los diferentes clones obtenidos.....	42
4	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos por PCR de la región 5'UTR.....	43
5	Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos del cDNA de la HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> .....	46
6	Alineamiento de las proteínas de reconocimiento de beta glucanos del Camarón <i>P. vannamei</i> (HDL-BGBP) y del langostino de agua dulce <i>Pacifastacus leniusculus</i> (BGBP).....	55
7	Predicción de la estructura secundaria de la proteína madura HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> .....	59
8	Comparación de las regiones hidrofóbicas de la HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> y BGBP de <i>P. leniusculus</i> realizados según el método HCA:.....	64
9	Comparación de los perfiles hidropáticos de la HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> y BGBP de <i>P. leniusculus</i> según el método de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (1982).....	67
10	Autoradiografía de un Northern blot para estimar el tamaño del mRNA de la HDL (HDL-BGBP) y el mRNA de L21 (control constitutivo) en <i>P. vannamei</i> .....	70
11	Autoradiografía de los productos de extensión del primer en la región 5'.....	72

### Índice de Figuras (continuación)

Figura		Página
12	Calidad del RNA total aislado de diferentes tejidos del camarón blanco.....	74
13	Expresión del mRNA de la HDL-BGBP de <i>P. vannamei</i> .....	76
14	Esquema del cDNA de la HDL-BGBP de camarón blanco representando diferentes combinaciones de primers.....	79
15	Análisis electroforético en geles de agarosa al 1,2% de los productos amplificados con las diferentes combinaciones de primers.....	81

## RESUMEN

En la hemolinfa del camarón blanco *Penaeus vannamei*, existe una lipoproteína de alta densidad (HDL) que participa en el transporte de lípidos y en el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos (BG), activando así, al sistema de defensa de este organismo, realizando una doble función con implicaciones en nutrición y defensa. La HDL-BGBP, ha sido estudiada ampliamente; en este trabajo se caracterizó el cDNA que codifica para esta proteína. Se obtuvo la secuencia completa del cDNA que tiene un tamaño de 6.3 Kb y un marco de lectura continuo de 4.4 Kb, con dos sitios ATG (MET) en las posiciones 49 y 625, y un codón de terminación TGA en la posición 4,412 nt; posee una larga extensión en el extremo 3'UTR con secuencias repetidas, incluyendo la señal de poliadenilación AATTAAA y la cola de poli A+.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA, tiene una identidad del 50 % con la BGBP del langostino de agua dulce *Pacifastacus leniusculus*, y esta similitud aumenta al 70% considerando los aminoácidos conservados. El cuadro de lectura continuo tiene 1454 aminoácidos formando el precursor de la proteína que presenta un tamaño teórico de 165.8 kDa. Solo 1257 aminoácidos corresponden a la proteína madura, con un tamaño de 141.8 kDa. La secuencia de la proteína madura tiene sitios consenso de corte (R(K)/X/X/R(K)) para enzimas del tipo subtilisina, que han sido reportadas como responsables del procesamiento post-traduccional de las proteínas y que predice la generación de la HDL-BGBP procesada, con un tamaño de 123.8 kDa, similar al de 125 kDa que se ha determinado por espectroscopía de masas para la proteína purificada. En la secuencia deducida se encontraron regiones características como sitios potenciales de glicosilación, fosforilación y la región RGD (característica de integrinas).

Los CSN/CILINDROS SC(IIIH)ari:ii dcd1H:idas ,kl 1;UNi\ Im:di::ni en qu III)l,i)la  
l,ohl:111-lic11tm; en 110:is i\, coil1cidil:11hi con los d11ils experin1:,11ak: ohtnid,,is  
pn:vi:11nc111c cül1 el prot11a purilkada, Ak111:t:, ,111:ilisis liidrop,'11icos y ,k reglum:s  
liid'olúbicns Æ p:11-tíl ;k las sce11cl1ci:ls ded11cid:ls ,k I', 1-1111111/11/y de P. /,11il11-c11/11s,  
,mlestr:m 11m Æ:l similitud ell los p:11r1mcs obtcl1id,ls, :l 11, su 1k ln; dii',re11ci:ls cl1 la  
sl.ct1( 11cia de a111inoúcidos,

El mRNA ql1c ,odil1c:1 para la 111)1,-BGBI' st: cl1co111ró cl1 dit:(1:111ccs 1cjidus con  
11myur :1b1111dailcia ,n liq,1,11up'11Hrc:ls y en 111;1101: c1111id:1d cl1 1111'l:;culu, pl:,;ópodos y  
hr:mq11i:ls, dclNI'Íí'i:Hhl inicialnwntc por RíJA blut, 1-stc res1111:l,lu 111: c;:ir11innado  
1m,dial11c 1(1'-1'(J, 111il1m11hl oligo1111c1cótidos p:lr:1 la H1)L.JICil1P y 1111:l 1111;111:l  
coilcc111n:ici)11 rk cDNA de (nd,1 11110 de los tc,iid,ls, (unHJ coil1rol ,:omli111ivo y  
1:01111mralivu :æ incluyó la cval1lació11 i:kl 111RNi\ tk :1ctin:1, dcbid,1 :l que cl1 /'.  
/el1ilm'11111s ñilil,;:11le 11lc se reportó la prsc11ci:1 del 1111,Ni\ 1k 1:l(i111' c11 11cp:1top:'111ccas,  
Estos 1:st11l :1dos mostraron que el gen coil1stit11ivo de act111'l (is •\8 veces 111;: abundante  
,j11; d 111RNi\ dü HDL-11(iBP <11 licpalop:'111c1\;n; y ó:k :l sl1 ve/. es 2) 1-cccs 111;:  
:11)1111;1111, que el mRNA rk 111úsc11lo, :l v,;:cs nm:, ,111111d:1111: qu,, pkÓ[1<J]1n, y 4 veces  
111:ls ab11mla111c ql11; ;11 br:111q11ias,

## INTRODUCCION

Sonora es un estado altamente productivo en ganadería, agricultura, minería y pesca. La gran extensión de litorales, hacen posible la captura de especies marinas de alto valor comercial entre las que destaca el camarón; a nivel nacional, Sonora ocupa el 2º lugar en captura con una participación del 38% y el 1er lugar en cultivo con una participación del 60% (SAGARPA, 2002). El cultivo de camarón cobra cada día mas importancia, y para el éxito de esta actividad es necesario tener el control de enfermedades que se presentan por estrés y debilitamiento debido a que la intensificación de los cultivos favorece el ataque oportunista de organismos patógenos.

Un factor importante a considerar para fortalecer a los organismos en cultivo son las dietas, en donde los componentes mas abundantes son proteínas, carbohidratos y lípidos. Los lípidos son indispensables en la dieta de crustáceos, ya que están involucrados en procesos esenciales tales como el crecimiento y la reproducción y son transportados por las lipoproteínas de la hemolinfa (Lee, 1991). Los lípidos esenciales como el colesterol (los crustáceos no tienen la capacidad de sintetizar *de novo* el anillo esterol), así como la exacta proporción de ácidos grasos polinsaturados como el n-3 y n-6 difieren entre las especies de camarones y está relacionado con la capacidad de elongar y desaturar los ácidos grasos de 18 carbonos de cualquiera de las series de n-3 o n-6 en ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados (Xu y cols., 1984). Sin embargo, a pesar de que el colesterol dietario y los ácidos grasos son importantes para el crecimiento de los camarones, existe también una relación directa entre los niveles dietarios de fosfatidilcolina y colesterol para la sobrevivencia, aunque esto no parece ocurrir en *P. monodon* (Chen, 1993, Yepiz-Plascencia y cols., 2000b).

Las lipoproteínas de la hemolinfa son las responsables del transporte de los lípidos desde los sitios de absorción hacia los sitios de utilización y almacenamiento. Los principales lípidos reportados para las lipoproteínas plasmáticas de camarones y

otros crustáceos son los fosfolípidos, esteroides, acilglicérols y ácidos grasos libres (Citado por Yepiz-Plascencia y cols., 2000b).

La lipoproteína de alta densidad-proteína enlazadora de  $\beta$ -glucanos (HDL-BGBP) ha sido estudiada por su doble función como transportadora de lípidos y como una proteína de reconocimiento, teniendo implicaciones en nutrición y en el sistema de defensa del camarón blanco *P. vannamei* (Yepiz-Plascencia y cols., 1998). Esta es una lipoglicoproteína con peso molecular aparente de 100 kDa, con glucosa y manosa en su estructura y aproximadamente 50% de lípidos, donde los principales componentes son los fosfolípidos (Ruiz-Verdugo y cols., 1997). La estructura secundaria está compuesta principalmente por hojas  $\beta$ , las cuales fueron determinadas mediante diroísmo circular usando la proteína purificada, también se sabe que forma agregados cuando interactúa con vesículas fosfolipídicas (Vargas-Requena y cols., 2002), pero hasta el momento se desconocen los mecanismos de la carga y descarga de los lípidos necesarios para realizar la función fisiológica.

La única proteína homóloga a la HDL-BGBP de camarón hasta ahora reportada, en otros organismos es la encontrada en el langostino *P. leniusculus*, en donde se ha descrito un cDNA codificante para 1330 aminoácidos y con un peso molecular estimado del precursor de 151.8 kDa (Cerenius y cols., 1994). Debido al gran tamaño de la proteína, la estrategia para determinar la estructura primaria (aminoácidos) por los métodos tradicionales sería muy laboriosa por lo que obtener la secuencia deducida a partir del cDNA resulta una metodología más viable.

Por lo anterior y destacando la importancia de la proteína en crustáceos, el presente trabajo tiene como objetivo principal el caracterizar el cDNA de la HDL-BGBP del camarón blanco *P. vannamei*, identificar los sitios expresión del mRNA que codifica para esta proteína y estimar el tamaño del mensaje; con estos resultados se pretende tener un primer acercamiento al conocimiento del gen y su regulación.

## ANTECEDENTES

### Lípidos en la Dieta de Crustáceos

Sonora está rodeado por una extensa zona de litorales, en donde la captura del camarón blanco *Penaeus vannamei*, representa una actividad económica importante para México. En años recientes la captura de este crustáceo ha disminuído considerablemente por la sobreexplotación y malas condiciones de los barcos pesqueros, como consecuencia se ha incrementado el interés por fomentar programas encaminados al fortalecimiento de la acuicultura. Uno de los principales retos para llevar a cabo esta actividad, es establecer dietas adecuadas que permitan el crecimiento y óptimo desarrollo de los camarones en cultivo.

Dentro de los principales constituyentes de las dietas para camarones se encuentran las proteínas, carbohidratos y los lípidos; estos últimos son considerablemente importantes ya que algunos son esenciales encontrándose entre los mas importantes los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexanoico y el colesterol (Dall y cols., 1990, Yepíz-Plascencia y cols., 1995). La importancia de los lípidos como constituyentes dietarios radica en la participación de éstos en procesos esenciales tales como crecimiento, maduración y reproducción, durante los cuales son utilizados como fuente de energía y para formar membranas celulares además de ser precursores de hormonas; también se han encontrado diferencias en concentración y distribución de lípidos en camarones silvestres y cultivados, lo que sugiere que estas diferencias son debidas al tipo de alimento que consumen (Yepíz-Plascencia y cols., 2000b).

Diferencias en concentración de los lípidos se observaron en músculo y hepatopáncreas de animales silvestres y de cultivo. Específicamente en *Penaeus monodon*, se observó que la concentración de fosfatidilcolina fue mas alta en organismos



silvestres, mientras que la del colesterol fue mas baja, confirmando así la importancia del aporte lipídico en la dieta. Los lipidos provenientes de la ingesta dietaria son transportados en medio acuoso sanguíneo o hemolinfa hacia los diferentes tejidos mediante proteínas plasmáticas desde los sitios de absorción o síntesis hasta los sitios de almacenamiento y utilización formando complejos de proteínas-lipidos, llamadas lipoproteínas (Lee, 1991; Yepiz-Plascencia y cols., 2000b).

### Lipoproteínas de Transporte

Las lipoproteínas plasmáticas de artrópodos, al igual que las de mamíferos, se han clasificado de acuerdo a su densidad como lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL). Las lipoproteínas de insectos, llamadas lipoforinas, son las mas estudiadas debido a que los organismos son de fácil manejo, cuidado, alta reproducción y bajo costo (Kanost y cols., 1990).

Con respecto a las lipoproteínas de crustáceos, la mayoría de los estudios se orientaron a las lipoproteínas específicas de las hembras (vitelina y vitelogenina), las cuales se encuentran involucradas en la vitelogénesis, un proceso esencial para la reproducción. Sin embargo, estudios en la última década han reportado HDL y VHDL plasmáticas que podrían ser mas importantes para el transporte de lipidos en todos los estadios de desarrollo, independientemente del sexo (Yepiz-Plascencia y cols., 2000b, Yepiz-Plascencia y cols., 2002). En pecidos, los reportes mas completos sobre lipoproteínas son los estudios realizados en *Penaeus japonicus* (Teshima y Kanazawa, 1979), *Penaeus semisulcatus* (Tom y cols., 1993) y *P. vannamei* (Yepiz-Plascencia y cols., 1995, Yepiz-Plascencia y cols., 2000b).

### **Lipoproteína de Alta Densidad (HDL) de *P. vannamei***

La primer lipoproteína plasmática reportada en el camarón blanco *P. vannamei* es una HDL no asociada con el sexo, que tiene una densidad flotante entre 1.11-1.17 g/mL lo cual la clasifica como una lipoproteína de alta densidad y contiene una apolipoproteína con una masa molecular estimada por SDS-PAGE de 100 kDa (Yepiz-Plascencia y cols., 1995); aunque recientemente se determinó por espectroscopía de masas un peso de 125 kDa (Vargas-Requena y Sotelo-Mundo, comunicación personal). Es además una proteína glicosilada que contiene oligosacáridos del tipo alto en manosa (high mannose) y presenta un punto isoeléctrico de 5.8, similar a la HDL de *Potamon potamius* (Stratakis y cols., 1992).

Los lípidos constituyen el 57% (p/p) de la HDL, de los cuales el 43% son fosfolípidos, 9.5% acilgliceroles, 4.8% colesterol y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres (Ruiz-Verdugo y cols., 1997). Los fosfolípidos son la clase mayoritaria de lípidos, similar a lo reportado en otros crustáceos como el cangrejo *Cancer magister*, la langosta espinosa *Panulirus interruptus*, el cangrejo *Cancer antennarius*, y los crustáceos de agua dulce *Potamon potamius* y *P. lentusculus* (Yepiz-Plascencia y cols., 2000b).

Estudios anteriores reportaron que en la composición de aminoácidos de la HDL destaca la proporción de asparagina/ácido aspártico y glutamina/ácido glutámico; característica también encontrada en las lipoproteínas plasmáticas de *P. potamius*, el gusano del tabaco: *Manduca sexta* y en la Apo A-I de humano. En contraste, la secuencia amino terminal de la HDL de *P. vannamei* solo es similar a la región del terminal amino de la BGBP de *P. californiensis* (Yepiz-Plascencia y cols., 1998) y de la BGBP de *P. lentusculus* (Ruiz-Verdugo y cols., 1997).

El estudio de la HDL de camarón usando dicroísmo circular, mostró un alto contenido de hojas  $\beta$ , y este arreglo secundario es similar al encontrado en lipoproteínas plasmáticas de los insectos *M. sexta*, *Locusta migratoria* y *Triatoma infestans*, a pesar de existir diferencias en el número y tamaño de las apolipoproteínas, así como en el tipo

de lípidos predominantes (Vargas-Requena y cols., 2002). De forma interesante, Vargas-Requena y colaboradores (2002), reportaron que la HDL forma agregados de alto peso molecular al interactuar con liposomas fosfolipídicos y este comportamiento es similar al observado en la LDL humana cuando se encuentra en contacto con dimiristoil fosfatidil glicerol debido a las interacciones lípido-proteína con las vesículas; sin embargo, Vargas-Requena y colaboradores no pudieron distinguir entre estos dos modelos: si hay agregación o fusión de membranas mediadas por la HDL-BGBP de *P. vannamei*, pero si hay evidencia de la interacción de la HDL-BGBP con las membranas lipídicas.

#### **Lipoproteína de Muy Alta Densidad (VHDL) de *P. vannamei***

Estudios recientes en *P. vannamei* reportaron una lipoproteína de muy alta densidad, con una densidad flotante entre 1.15-1.21 g/L, lo cual la clasifica dentro de las VHDL's. Esta es una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 400 kDa formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro (Yepiz-Plascencia y cols., 2002), y previamente caracterizada como la proteína de coagulación (CP) en *P. vannamei* (Montaño-Pérez y cols., 1999). La evidencia presentada para argumentar que la VHDL-CP son la misma proteína se basó en la comparación de aminoácidos de las secuencias idénticas del terminal amino (15 residuos para la VHDL-CP de *P. vannamei* y 10 residuos para la CP de *P. vannamei* (Yepiz-Plascencia y cols., 2002).

La VHDL-CP de *P. vannamei* contiene lípidos que fueron identificados por tinción con negro de sudan y rojo oleoso, correspondiendo al 9-15 % (p/p) cuantificados mediante el método de la sulfofosfovainillina. Estos datos son similares a los reportados para los lípidos de la VHDL-CP del langostino de agua dulce, *P. tentaculatus* (11 %) (Hall y cols., 1995) y para la VHDL del cangrejo de arena, *Ibacus ciliatus* (6 %) (Komatsu y Ando, 1998).

En contraste con la HDL-BGBP, en la VHDL-CP la estructura secundaria está conformada por 32 % de hélices alfa y 33 % de hojas beta, pero esto último similar a los

resultados reportados para la proteína de coagulación del camarón tigre *P. monodon* y la lipoforina de muy alta densidad de *M. sexta* (Yepiz-Plascencia y cols., 2002).

### Lipoproteínas y el Sistema de Defensa

A pesar de que los artrópodos carecen de inmunoglobulinas, poseen un sistema muy eficiente que los protege de parásitos y que remueve las partículas no propias de la circulación. Entre las proteínas de la hemolinfa se encuentran las proteínas de reconocimiento, que tienen la capacidad de reconocer estructuras en microorganismos invasores y activar o incrementar la respuesta de defensa (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Una de estas proteínas reconoce  $\beta$ -glucanos de origen microbiano formando un complejo que es capaz de activar el sistema de la profenoloxidasas, por lo que se le ha llamado BGBP (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000, Yepiz-Plascencia y cols., 1998). La HDL y la BGBP es la misma proteína tanto en camarón (Yepiz-Plascencia y cols., 1998) como en el langostino *P. leniusculus* en donde fue descrita por primera vez (Hall y cols., 1995).

La bifuncionalidad de las lipoproteínas plasmáticas está presente también en la lipoproteína de muy alta densidad (VHDL) de *P. leniusculus* (Hall y cols., 1995) y de *P. vannamei* ya que transporta lípidos (Yepiz-Plascencia y cols., 2002), y es la proteína responsable de la formación de un coágulo que evita la pérdida de hemolinfa tras un daño, es decir, participa en el proceso de coagulación. En camarón blanco se describió primeramente esta proteína como la proteína de coagulación (CP) (Montaño-Pérez y cols., 1999), que está formada por dos subunidades idénticas de 180-200 kDa y forma largos polímeros por una reacción catalizada por la transglutaminasa de hemocitos, además contiene lípidos en su estructura. Esta bifuncionalidad fue observada

primeramente en *P. leniusculus* (Hall y cols., 1995) y en el cangrejo de arena, *Ibacus ciliatus* (Komatsu y Ando, 1998).

Recientemente se demostró en larvas de palomilla de la cera, *Galleria mellonella*, que la inmunoestimulación del insecto con bacterias induce cambios en la composición lipídica de las lipoproteínas de la hemolinfa (Dettloff y cols., 2001). Después de las primeras cuatro horas de la inmunoestimulación, una parte de las lipoproteínas larvales de alta densidad (HDLp) se convierten a lipoproteínas de baja densidad (LDLp). Este fue el primer reporte en insectos de la activación directa del metabolismo de los lípidos y las reacciones inmunes. No obstante, los detalles de los mecanismos de la estimulación inmune por las lipoproteínas no se conocen todavía.

Para la formación de la LDLp, la proteína lleva a una reasociación lipídica después de la infección bacteriana, por lo que Dettloff y cols (2001) concluyen que el proceso de respuesta requiere el transporte de lípidos para obtener energía, permitiendo la formación de la LDLp. Esta Lp puede actuar entonces como un estimulador, activando a los hemocitos y a su vez induciendo el sistema de defensa del insecto concomitante con la movilización de los lípidos para la formación de las LDLp. Si el metabolismo de lípidos y el sistema inmune están relacionados en este mecanismo, ambos pueden influenciarse uno a otro (Dettloff y cols., 2001).

Además de las proteínas bifuncionales que participan activamente en el sistema de defensa de los invertebrados, recientemente se han estudiado proteínas de reconocimiento que están involucradas en la activación de la cascada de la profenoloxidasa que no son lipoproteínas, tal es el caso de la proteína que une glucanos y lipopolisacáridos de el gusano de tierra *Eisenia foetida*, esta es una proteína de 42 kDa que se encuentra en el fluido celómico y es llamada el factor 1 citolítico celómico (CCF-1), anteriormente descrito por su participación en la opsonización y por sus propiedades hemolíticas del fluido celómico. La clonación y secuenciación de este factor, mostró una homología con la región de las beta-1,3 y beta-1,4-glucanasas, así

como con el factor G de coagulación de *Limulus polyphemus* y con la proteína unidora de bacterias Gram (-) de *B. mori* (Beschín y cols., 1998).

En el langostino, *P. leniusculus* (Lee y cols., 2000), se caracterizó a una proteína unidora de lipopolisacáridos y beta-1,3-glucanos (LGBP) a partir de hemocitos. La LGBP tiene una masa molecular de 36-40 kDa y tiene la capacidad de unir laminarina, curdlan, pero no tiene capacidad de unir peptidoglicano. La clonación y secuenciación de la LGBP demostró que la secuencia tiene regiones similares a la proteína unidora de bacterias Gram (-) así como a las beta 1,3-glucanasas. La LGBP también mostró similitud en estructura y función con el factor citolítico celómico 1 (CCF-1) de *E. foetida* (Beschín y cols., 1998; Lee y cols., 2000). En el camarón tigre, *P. monodon*, se caracterizó una proteína que une beta 1,3-glucanos (GBP), ésta tiene una masa molecular de 31 kDa y a partir del banco de genes de hemocitos se logró aislar el cDNA que codifica para la GBP. La secuencia deducida obtenida presentó una identidad del 67 % y una similitud del 76 % al compararla con la secuencia deducida del la LGBP de langostino), sin embargo la GBP no tiene la capacidad de unir lipopolisacáridos (Sritunyaluksana y cols., 2002).

Los análisis de alineamientos de GBP de *P. monodon* con proteínas de reconocimiento de otros invertebrados que contienen regiones del tipo glucanasa revelaron una alta homología de la región del terminal amino en todas las secuencias, sugiriendo que esta región está involucrada en la unión a la pared celular de los microorganismos, lo cual ha sido demostrado para la proteína de reconocimiento de beta-1,3-glucanos (BGRP) de *Bombyx mori* (Sritunyaluksana y cols., 2002, Ochiai y Ashida, 2000). La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos demostró que la BGRP contiene una región que va desde la Thr 264 a la Pro 386, similar al sitio catalítico de las  $\beta$ -1,3-glucanasas, sin embargo, se demostró que no tiene afinidad considerable por los beta-1,3-glucanos, y que mediante un péptido recombinante de la región comprendida entre la Tyr 1 a la Ala 102 de la BGRP de *B. mori*, unió fuertemente a los beta-glucanos demostrando de esta manera que la región del terminal amino es la involucrada en el reconocimiento (Ochiai y Ashida, 2000).

### Genes de Lipoproteínas

La mayoría de los estudios de lipoproteínas se han enfocado a la purificación y caracterización bioquímica, así como a estudiar el papel que desempeñan en la fisiología de los diferentes organismos. Las apolipoproteínas, son moléculas de gran tamaño lo que dificulta determinar la secuencia de aminoácidos en forma directa. El acercamiento al conocimiento de la secuencia primaria es técnicamente mas conveniente a través de la traducción del cDNA, lo que ha sido posible con el avance de las técnicas de biología molecular.

#### **Genes de Lipoproteínas de Insectos**

ApoLp-III de *M. sexta*. El transporte de lípidos en insectos difiere de los mamíferos. La principal lipoproteína plasmática en insectos, llamada lipoforina actúa como un vehículo reciclable que acarrea lípidos principalmente diacilglicérols, colesterol y carotenoides. En el gusano del tabaco, *M. sexta*, la lipoforina larval contiene dos apolipoproteínas: la apolipoproteína I y la apolipoproteína II, y se sintetiza en el cuerpo graso para acarrear los lípidos ingeridos hacia los tejidos y los depósitos de almacenamiento. En el adulto, el transporte de lípidos es muy importante ya que sirven de combustible para el vuelo; la principal forma de la lipoforina en adultos es del tipo de alta densidad y está compuesta por la apoLp-I, apoLp-II así como también de dos moléculas de una tercera apoproteína llamada apoLp-III y un 50 % de lípidos (Cole y cols., 1987).

La apoLp-III es una proteína pequeña que une lípidos, no contiene carbohidratos en su estructura. La primera secuencia reportada para una lipoforina de insecto fue la apoLp-III de *M. sexta* que se determinó por secuenciación del cDNA y la de la proteína (mediante degradación de Edman). La proteína madura tiene 166 aminoácidos y el

cDNA codifica además 23 aminoácidos que no están presentes en la proteína madura que se encuentra en la hemolinfa, por lo que se sugiere procesamiento cotraduccional y proteolítico en la proteína secretada (Cole y cols., 1987).

Los resultados derivados de los análisis computacionales de la apoLp-III revelaron que la proteína deducida está conformada por unidades repetidas de tetradecapéptidos, las que potencialmente forman las hélices anfipáticas; las lipoproteínas humanas se componen de secuencias repetidas en tandem de 11 aminoácidos y aunque presentan similitud en ciertos residuos de estos tandems con la apoLp-III de insecto, el grado de identidad entre secuencias es muy bajo. La secuencia tiene similitud con algunas de las apolipoproteínas humanas (apoE, A-IV y CI), en contraste, no presenta homología con las proteínas unidoras de ácidos grasos y retinol. (Cole y cols., 1987).

ApoLp-I y ApoLp-II de *M. sexta*. A partir de un banco de genes de cDNA del cuerpo graso del gusano del tabaco, se obtuvo el cDNA que codifica para el precursor de la apolipoproteína I y II (ApoLp-I y ApoLp-II). La secuencia del cDNA tiene 10,138 pb, de los cuales 9,914 conforman el marco de lectura abierto y a partir de esta secuencia se deducen 3,305 aminoácidos de la proteína incluyendo los 23 residuos del péptido señal. Es claro identificar en el cDNA la señal consenso de poliadenilación AATAAA (10,122 nt) aunque la cola de poliA<sup>+</sup> se perdió durante la estrategia de clonación. El arreglo del precursor se apoyó con los resultados de la secuencia aminoacídica de los péptidos tripticos de la ApoLp-I y de la ApoLp-II obtenidos previamente, posicionando a la ApoLp-II hacia el extremo amino terminal y a la ApoLp-I hacia el extremo carboxilo (Sundermeyer y cols., 1996).

El precursor de la proteína contiene dos sitios de glicosilación (NXT/S), uno en la apoLp-II (residuos 643-645) y uno en la apoLp-I (residuos 2769-2771), lo cual es consistente para las apolipoproteínas purificadas que son glicosiladas, otros sitios de modificación postraduccional no se observa en la secuencia. Los análisis de homología indican que el precursor de la proteína ApoLp-I y II presenta una identidad del 19.8 % y



una similitud del 42.9 % con la apolipoproteína B humana, estos porcentajes son debidos a pequeñas regiones de similitud o identidad mas que a la identidad de toda la secuencia, y se encontraron pequeñas similitudes con vitelogeninas de rana y pollo pero ninguna significancia con las de insectos (Sundermeyer y cols., 1996).

ApoLp II/I de *L. migratoria*. El cDNA de la ApoLp II/I (GenBank AJ130944) tiene un tamaño de 10,766 pb, con un marco de lectura grande que inicia con el ATG en la posición 8 nt y finaliza con el codón de terminación TGA en la posición 10,148 nt seguido de la señal de poliadenilación característica en la posición 10,720 nt. El marco de lectura abierta predice una proteína de 3,380 aminoácidos. El péptido señal comprende los primeros 21 residuos de la secuencia y el terminal amino para la ApoLp I se localizó en los residuos 721-737 y para la ApoLp-II en los residuos 22-33 confirmados por la secuencias obtenidas de las proteínas purificadas. El precursor presenta seis sitios potenciales de glicosilación (NXT/S, en donde X es cualquier aminoácido), dos en la apoLp-II y cuatro en la ApoLp-I y dos sitios "débiles" de glicosilación (NXT/S, en donde X es D, W, P) en la ApoLp-I (Bogerd y cols., 2000).

Los análisis de homología mostraron que la ApoLp II/I de langosta es 27 % idéntico y 43 % similar a la ApoLp II/I de *M. sexta* (Sundermeyer y cols., 1996), y 35 % idéntica y 52 % similar a la ApoLp-II de *Aedes aegypti* (Van Heusden y cols., 1998) y similitudes significativas se encontraron con la partícula grande transportadora de lípidos, el precursor del factor von Willebrand y la mucina 2 intestinal de humano (Babin y cols., 1999). El transcrito de ApoLp-II-I, mostró un tamaño de aproximadamente 10.8 Kb y es expresado fuertemente en cuerpo graso de organismos adultos mayores (langosta) así como en adultos jóvenes, una señal fuerte se observó en cerebro, una señal débil en músculo de vuelo y no se observó expresión en oocitos, músculo de la pierna y glándula media (Bogerd y cols., 2000).

ApoLp-III de *G. mellonella*. Estudios recientes con la ApoLp-III nativa de *G. mellonella* indicaron la relación inesperada de la proteína en la activación del sistema inmune del

insecto y la correlación con la fisiología del transporte de lípidos (Weisner y cols., 1997). El cDNA que codifica para la ApoLp-III de *G. mellonella*, tiene una secuencia de 699 pb que produce un precursor de 186 aminoácidos, de los cuales 23 aminoácidos corresponden al péptido señal y 163 aminoácidos a la proteína madura. La comparación de la secuencia del cDNA de *G. mellonella* con cDNA de ApoLp-III de insectos lepidópteros mostraron altas similitudes, por ejemplo con *M. sexta* (65 %), y *Bombyx mori* (65-68 %), mientras que para insectos no lepidópteros estas resultaron bajas: *L. migratoria* (31 %), *Acheta domesticus* (16 %) y *Derobrachus germinatus* (4 %). En cuanto a la similitud de la secuencia deducida los resultados fueron los siguientes: *M. sexta* (69 %), *B. mori* (60-64 %), *A. domesticus* (20 %), *D. germinatus* (19 %) y para *L. migratoria* (12 %) (Niere y cols., 1999).

ApoLp-III de *B. mori* y *B. mandarina*. La secuencia del cDNA para la apoLp-III de dos cepas de *B. mori* (N4 y P50) y de las cepas japonesa y china de *B. mandarina* fueron determinadas, al ser deducidas y analizadas se encontró una alta similitud entre ellas (95-98 %). Las cuatro secuencias de *Bombyx* mostraron una similitud importante al ser comparada con la secuencia de la apoLp-III de otro insecto lepidóptero, *M. sexta* ( 83-84 %) (Cole y cols., 1987); particularmente esta similitud se observó en las cinco hélices anfipáticas, de las cuales se infiere su participación en la unión de la apoLp-III a la lipoforina (Yamauchi y cols., 2000).

La secuencia nucleotídica que corresponde a la región codificante es idéntica en la cepa china de *B. mandarina* y la cepa P50 de *B. mori*, lo cual confirma la suposición de que la cepa mas relacionada con la cepa original domesticada es la P50. La cepa N4 de *B. mori* está mas relacionada con éstas secuencias que con la cepa japonesa de *B. mandarina*, sugiriendo de esta manera que la cepa japonesa de *B. mandarina* se separó de la cepa china de *B. mandarina* antes de la domesticación de la *B. mori* (Yamauchi y cols., 2000).

## Genes de Lipoproteínas de Crustáceos

Hasta el momento, los reportes que se tienen sobre genes de lipoproteínas en crustáceos son escasos, solo se han reportado las secuencias obtenidas a partir del cDNA de la BGBP (Cerenius y cols., 1994) y de la VHDL-CP de *P. leniusculus* (Hall y cols., 1999), así como la del cDNA de la proteína de coagulación de *P. monodon* (Yeh y cols., 1999). A continuación se describirán las principales características de estos cDNA's.

BGBP de *P. leniusculus*. El cDNA de la BGBP de *P. leniusculus* (GenBank X80867) tiene 4679 pb, el primer codon ATG se encuentra en la posición 154 pb, el cual es seguido por un marco de lectura abierta de 4,017 pb seguido de un codón de terminación TAG y una región 3' no codificante de 506 pb; en esta región codificante no se encontró la señal característica de poliadenilación ni la cola de poli A<sup>+</sup>. El marco de lectura abierto codifica para una proteína deducida de 1339 aminoácidos, y Cerenius y cols (1994) proponen que sufre procesamiento postraduccional.

La secuencia deducida del cDNA de la BGBP fue confirmada mediante los datos obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos de péptidos obtenidos por digestiones proteolíticas de la proteína purificada así como la comparación con la secuencia del terminal amino obtenido de la proteína madura. El carboxilo terminal de la proteína madura se determinó mediante hidrozínólisis, y el último aminoácido de la proteína es Histidina, mientras que el último aminoácido deducido a partir del cDNA, es Isoleucina. Los autores de nueva cuenta proponen que la proteína sufre también procesamiento del carboxilo terminal (Cerenius y cols., 1994).

Las características mas importantes de la proteína deducida son: carece de péptido señal, ausencia de residuos de cisteína y presenta secuencias repetidas Glu-Asn-Phe-Glu-Thr, Asp-Ile-Asn-Ile-Ser, Glu-Gly-Lys-Leu-Val y Asp-Lys-Val-X-Thr-Leu, estas secuencias se presentan dos veces a lo largo del marco de lectura abierta de la BGBP de *P. leniusculus*, además de encontrar la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) involucrada en interacciones celulares. A la fecha no se tiene otro reporte de la secuencia de un cDNA para proteínas bifuncionales de este tipo en otros organismos, en particular

la secuencia del langostino no presenta similitud con las secuencias reportadas para lipoproteínas de humanos y de insectos.

CP de *P. leniusculus*. La secuencia reportada del cDNA que codifica para la proteína de coagulación, GenBank (AF102268), tiene un tamaño de 6,390 pb el cual es similar al tamaño de 7 Kb que presentó el transcrito de hepatopáncreas de *P. leniusculus* (Northern blot). El cDNA tiene una extensión de 158 nt en la región 5'UTR y se encontraron secuencias repetidas formadas por 10 nucleótidos, las cuales se repiten 3 veces; estas repeticiones se observaron también en la región 3'UTR (1072 nt), en donde secuencias de 49 nucleótidos se repiten ocho veces. Además se encontraron dos señales de poliadenilación y la cola de poliA<sup>+</sup> (Hall y cols., 1999). El marco de lectura de 5,166 nt que codifica para una proteína de 1,721 aminoácidos, presenta un péptido señal de 15 residuos seguido por el terminal amino, el cual reafirma los datos obtenidos con la proteína madura.

La secuencia del terminal amino de la VHDL-CP, es muy similar a las CP's de otros crustáceos, al fibrinógeno de la langosta y a la VHDL del cangrejo de arena. La secuencia completa deducida tiene similitud con las vitelogeninas de insectos, aunque la similitud es baja, hay algunas características similares como el sitio de procesamiento proteolítico RXRR presente en vitelogeninas y así como las cisteínas presentes en el terminal carboxilo que también están presentes en la CP, las cuales presentan similitud con el dominio D del factor von Willebrand en mamíferos (Hall y cols., 1999).

CP de *P. monodon*. En *P. monodon* (GenBank AF089867), la secuencia del cDNA es de 6124 pb, incluyendo 502 pb de la región 5'UTR, donde se encontraron regiones repetidas (CCACCACC, CTTCTTCCT) y un marco de lectura abierto de 5010 pb y una región 3'UTR de 612 pb; en esta región se encontraron dos sitios de poliadenilación (AATAAA) y secuencias repetidas (AATAT, ATTTCTT, TTTCTG). La proteína deducida es de 1670 aminoácidos y posee un péptido señal de 14 residuos. La autenticidad de la secuencia del cDNA fue confirmada por las secuencias aminoacídicas de los diferentes fragmentos obtenidos de la hidrólisis con CNBr y con la digestión

proteolítica de la proteína de coagulación purificada (Yeh y cols., 1999). Esta secuencia presentó una similitud del 36% con la proteína deducida de *P. lentusculus* (Hall y cols., 1999) y destaca la similitud que estas dos secuencias presentaron al ser comparadas con la secuencia de vitelogeninas de insectos, la apolipoproteína B y el factor de la coagulación von Willebrand de mamíferos (Yeh y cols., 1999).

A diferencia de otros miembros de la familia de las vitelogeninas, las características estructurales más importantes de la proteína deducida del camarón son: un dominio rico en Lys, cinco repeticiones de la secuencia Ser-Lys-Thr-Ser y otra región rica en Ser/Thr y una región rica en Gln y una región poliglutamina en el extremo del terminal carboxilo de QQQAQQQQQQVQGTQ. Exceptuando esta última región, las demás características se conservan en la CP de langostino, pero la de langostino posee menos SKTS pero más repeticiones de la secuencia TKTTG que la de camarón (Hall y cols., 1999, Yeh y cols., 1999).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar el cDNA de la HDL-BGBP de camarón blanco *Penaeus vannamei* y evaluar su expresión

### Objetivos Particulares

- Aislar y purificar el clon de cDNA de la HDL-BGBP de camarón.
- Obtener la secuencia nucleotídica del cDNA y de aminoácidos deducida completa
- Determinar el tamaño del mRNA y evaluar la expresión en diferentes tejidos.
- Mapear las regiones 5' y 3' del cDNA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales y Reactivos

Los reactivos y materiales utilizados para esta investigación fueron de alta calidad, grado biología molecular, libres de ribonucleasas, deoxiribonucleasas y pirógenos, esterilizados por autoclave de acuerdo a las necesidades. El agua utilizada fue grado destilada, bidestilada y Milli Q (18 $\Omega$ ).

### Animales

En este trabajo se utilizaron camarones *P. vannamei* juveniles (10-12 g de peso) y adultos (15 a 18 g de peso), los cuales se mantuvieron en un acuario experimental del CIBNOR, Guaymas y del ITESM campus Guaymas bajo condiciones controladas (24  $\pm$  4°C, salinidad de 36 partes por mil) hasta que fueron transportados a CIAD y se utilizaron para extraer la hemolinfa y disectar los tejidos para los diferentes análisis.

### Diseño de Oligonucleótidos Específicos para HDL

Para determinar la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la HDL-BGBP, la proteína purificada se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida del 7.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras y fue transferida a membrana de Immobilon P. La membrana se tiñó con azul de Coomassie al 0.1%, se lavó exhaustivamente con agua destilada y fue sometida a degradación de Edman como se describe en (Ruíz-Verdugo y cols., 1997, Yepiz-Plascencia y cols., 1998) en un secuenciador Applied Biosystem Protein Sequencer 477A de la División de Biotecnología de la Universidad de Arizona. Para determinar la secuencia de péptidos internos, la proteína se sometió a digestión con tripsina, los péptidos resultantes se

analizaron por espectrofotometría de masas (MALDI-TOF MS) desarrollada en un aparato Perseptive Biosystems Voyager-DE STR (Harvard Microchemistry Facility, Cambridge, MA USA) y se sometieron también a degradación de Edman.

Basados en la secuencia de aminoácidos del amino terminal (*DAGQASLAGNFNSLR*) y dos secuencias internas (*IDINLADINPTS* y *SDGFETLEGNIEAK*) de la HDL-BGBP, se diseñaron oligonucleótidos (primers) degenerados correspondientes a los aminoácidos señalados en cursivas y negritas: 5'GCCGCTCGAGGGNCARGC*W*SIYTIGCNGGNAAYTTYAA 3' (HDLNTA), 5'GCCGCTCGAGGGTTIATR*T*CNGCIATRTT*A*TRTC 3' (HDL5A) y 5'GCCGCTCGAGGCYTCIATRTTNC*C*YTCNARIGTYTC3' (HDL6A), que fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX, USA), además se les adicionó una extensión de 10 bases la cual incluye el sitio de corte para la enzima *Xho* I (subrayado) y un sitio estabilizador para la enzima al inicio del primer (4 bases) y fueron utilizados en dos combinaciones HDLNTS-HDL5A y HDLNTS-HDL6A.

Para la amplificación se utilizó cDNA de hepatopáncreas de camarón blanco y banco de genes de cDNA de hepatopáncreas de camarón blanco como DNA templado (su obtención se describe detalladamente en la pág. 30) y un programa de PCR poco astringente, que consistió en 3 min a 94°C, 1 min a 55°C, 3 min a 72°C por un ciclo; 3 min a 94°C, 1 min a 42°C, 3 min a 72°C por un ciclo; 3 min 94°C, 1 min 52°C, 3 min 72°C por 33 ciclos y finalmente una extensión de 10 min a 72°C y 4°C por tiempo indefinido. La PCR se hizo en un termociclador Perkin Elmer 480 (Perkin Elmer Corp., Norwalk CT, USA) siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 1.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se clonaron inmediatamente en el vector pCR 2.1 TOPO-TA de 3.9 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del proveedor: se utilizaron 4 µL de la reacción de PCR, 1 µL de solución salina (NaCl 1.2 M y MgCl<sub>2</sub> 0.06 M) y 1 µL de pCR 2.1 TOPO-TA (10 ng/µL). Esta reacción se incubó a temperatura ambiente (25°C)



por 30 min. Se tomaron 2  $\mu$ L de esta reacción y se realizó la transformación química en 50  $\mu$ L de células One Shot<sup>®</sup> TOP 10 F' *E. coli* competentes (las cuales se descongelaron en hielo) y se mezclaron suavemente con los dedos. Se incubaron en hielo 30 min, se les dió un choque térmico de 30 s en baño de agua a 42°C sin agitar y se transfirieron inmediatamente a hielo por lo menos 2 min, se les adicionó 250  $\mu$ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM). Después se incubaron horizontalmente en un agitador Lab-Line 3527 (Lab-line, Melrose Park, IL, USA) a 250 rpm por 1 h a 37°C, se colocaron 150, 100 y 50  $\mu$ L en placas Petri con medio LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.

**Tabla 1.** Condiciones para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los primers sintéticos específicos de HDL-BGBP

Reactivo	Cantidad	Concentración Final
10X PCR Buffer + MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ L	1X*
10 mM dNTP's	5 $\mu$ L	1 mM (mezcla)*
Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ L)	0.4 $\mu$ L	2 U
DNA templado <sup>#</sup>	4 $\mu$ L	-
cDNA de Hep. de C. beo.**	2 $\mu$ L	-
Primer HDL-NTS 2.5 $\mu$ M***	10 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Primer HDL5A-HDL6A 2.5 $\mu$ M****	10 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	Ajustar Vol. Final	
Vol. Reacción	50 $\mu$ L	

\* (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, pH 8.3).

\* (dATP 0.25 mM, dTTP 0.25 mM, dCTP 0.25 mM y dGTP 0.25 mM).

# Genoteca de cDNA de Hepatopáncreas Título 1.1 x 10<sup>9</sup> ulp/ $\mu$ L.

\*\* Aproximadamente 200 ng de cDNA.

\*\*\* Primer Sentido y \*\*\*\* Primer Antisentido.

Las colonias obtenidas se contaron y se calculó la eficiencia de transformación usando como plásmido control 10 ng de pUC18 (Sambrook y cols., 1989). Las colonias blancas (potenciales recombinantes) se inocularon en medio líquido LB con ampicilina y fueron incubadas a 37°C toda la noche y se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) y los recombinantes potenciales se digirieron con enzimas de restricción *Eco* RI, *Bam* HI y *Pst* I para determinar el tamaño del inserto. Los productos obtenidos se llamaron pPvHDL1 y pPvHDL2 (de las combinaciones HDLNTA-HDL5A y HDLNTA-HDL6A respectivamente) y se enviaron a secuenciar al Laboratory of Molecular Systematic Evolution (LMSE) de la Universidad de Arizona; para este análisis se utilizaron muestras de DNA de doble cadena en una concentración de 0.2 µg/µL y se analizaron en un equipo automático 2 ABI 337 secuenciándose con los primers universales T3 y T7.

#### Búsqueda en la Genoteca de cDNA de Hepatopáncreas de *P. vannamei*

Se construyó una genoteca de cDNA de hepatopáncreas (ZAP Express cDNA Synthesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA), la cual presentó un título de  $1.1 \times 10^9$  ufp/µL (unidades formadoras de placas de lisis) y se realizó una búsqueda primaria utilizando un fragmento de HDL-BGBP (aproximadamente 2 Kb), el cual se generó del clon pPvHDL2 por digestión con *Eco*R I y fue purificado por GeneClean II (BIO101, La Jolla, CA). Este fragmento se marcó utilizando DIG-dUTP y el sistema DIG-labeled (Boehringer-Mannheim-Roche, Indianapolis, IN), se determinó la eficiencia del marcaje y la sonda se utilizó para el screening de 250,000 ufp de la genoteca.

Se utilizaron membranas Hybond A<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) y se cortaron los discos del tamaño de las placas Petri 150 x 15 mm, las cuales se colocaron sobre las placas y se transfirió el DNA por capilaridad por 20 min, se marcó con tinta china la orientación de las membranas y se procedió a desnaturalizarlas con una solución de 1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH por 2 min a temperatura ambiente. Se neutralizaron con

una solución de 1.5 M NaCl y 0.5 M de Tris-HCl (pH 8.0) por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se equilibraron en una solución de 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) y 2X SSC por un tiempo no mayor a 30 s. Las membranas se colocaron sobre un papel filtro para retirar el exceso de líquido y se les dió dos veces el tratamiento entrecruzador en el GS Gene Linker<sup>TM</sup> UV Chamber (BIORAD) C3, 30 sec 150 mJ.

Se llevó a cabo una prehibridización a 68°C por 30 min en solución de hibridización estándar (5X SSC, 0.1% N-laurylsarcosina, 0.02% SDS, 1% solución de bloqueo (Boehringer-Mannheim-Roche, Indianapolis, IN)) tomando en consideración 10 mL de solución por cada membrana (50 mL para 5 membranas) y las hibridizaciones se llevaron a cabo toda la noche (16 h) a 65°C en solución de hibridización estándar (utilizando los mismos volúmenes que en la prehibridización) y se le adicionó la sonda marcada, utilizando 1.39 ng de sonda/ mL de solución de hibridización. Las membranas se lavaron dos veces con 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 5 min y dos veces con 0.1X SSC y 0.1% SDS a 68°C por 15 min en agitación.

Las membranas se enjuagaron brevemente con buffer de lavado (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl, pH 7.5 y 0.3% Tween 20 (v/v)), posteriormente se incubaron con solución de bloqueo 1X por 2 h, después de esto se incubaron con el anticuerpo conjugado Anti-DIG-AP (Boehringer-Mannheim-Roche, Indianapolis, IN) en una concentración de 150 mU/ml en solución de bloqueo por 2 h y se realizaron dos lavados con buffer de lavado. Las membranas se equilibraron por 5 min con buffer de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) y se colocaron en una solución de detección recién preparada con buffer de detección y los substratos azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato (NBT/BCIP, por sus siglas en inglés), cuando se observaron zonas de coloración azul morado se detuvo la reacción de la fosfatasa alcalina sumergiendo las membranas en agua destilada limpia.

Se realizaron dos screening mas (secundario y terciario) hasta purificar a homogeneidad los positivos potenciales. Los fagemidos se obtuvieron por excision *in*

*vivo* utilizando un fago auxiliar ( ExAssist Helper Phage, Stratagene) con la cepa de *E. coli* SOLR (Stratagene), posteriormente se obtuvo el DNA plasmídico de estos clones y se secuenciaron utilizando las facilidades del LMSE de la Universidad de Arizona, como se describió anteriormente; de esta búsqueda se obtuvo un clon de aproximadamente de 4.5 Kb, el cual se llamó pPvHDL3.

Las secuencias obtenidas de los clones pPvHDL1, pPvHDL2 y pPvHDL3, se analizaron y una vez que se depuraron y se alinearon entre sí, sirvieron como molde para diseñar nuevos primers, siguiendo una estrategia llamada Primer Walking. Estos primers se diseñaron en base a las secuencias parciales y fueron evaluados con el programa Oligo Calculator de la compañía Genosys ([http://www.genosys.com/cgi-win/oligo\\_calonly.exe](http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe)) y considerando las características de longitud, T<sub>m</sub> (temperatura de fusión), formación de estructura secundaria, porcentaje de GC y formación de dímeros entre sí. Al amplificar por PCR los productos internos del cDNA de HDL-BGBP de camarón se utilizó un programa llamado HDL que consiste en 3 min a 94°C, 1 min a 60°C, 3 min a 72°C por un ciclo; 3 min a 94°C, 1 min a 52°C, 3 min a 72°C por un ciclo; 3 min 94°C, 1 min 55°C, 3 min 72°C por 30 ciclos y finalmente una extensión de 10 min a 72°C y 4°C por tiempo indefinido, y estas ampliificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 DNA Engine (MJ Research, MA, USA). Los fragmentos fueron purificados por columnas de Qiagen (QIAGEN, CA, USA) y secuenciados directamente con las especificaciones para productos de PCR de doble cadena.

La estrategia de subclonación se utilizó para obtener las regiones del cDNA faltantes y ensamblar las secuencias obtenidas de los 6.3 Kb y esta subclonación se llevó a cabo utilizando el clon pPvHDL3, el cual fue utilizado como molde para amplificar por PCR un fragmento de 4.5 Kb utilizando los primers específicos HDL1Plus-HDL4Aminus (5' CCT TGG TCA GAA TGA AAT CAC 3' y 5' TCG ATC CTC TCG AAG TCT TCG 3', respectivamente) y no tener la interferencia del vector, este producto fue digerido con las enzimas *EcoR* I, *Xho* I, *Hind* III, *Sal* I (Gibco BRL) y se analizaron los productos de digestión en gel de agarosa al 1%. Las reacciones de digestión se

purificaron por columnas de Qiagen y se eluyeron con 30  $\mu$ L de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. Se evaporó el volumen a la mitad y se realizó una adición de A colgante: 15  $\mu$ L de la digestión (purificada), 1  $\mu$ L de Buffer PCR 10 X (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 150 mM, KCl 500 mM, pH 8.3 ), 1  $\mu$ L de dATP 2.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ L de DNA polimerasa recombinante producida en el laboratorio (*kTaq*), se incubó esta reacción a 70°C por 20 min y se colocó en hielo.

Para la ligación se utilizó 10  $\mu$ L de la reacción anterior, 5  $\mu$ L de Buffer ligasa 2X (Tris-HCl 60 mM, pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 20 mM, ATP 1 mM, PEG 10%), 1  $\mu$ L (50 ng) del vector pGEM-T Easy System I de 3.015 Kb (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ L de la enzima T4 DNA ligasa 3 unidades weiss/ $\mu$ L (Promega) y se ligó por 16 h a 4°C. Se prepararon células DH5 $\alpha$  químicamente competentes (Yepiz-Plascencia G. 2000) y se mantuvieron a -80°C en stocks de glicerol hasta su uso. Una vez que transcurrió el tiempo de ligación, las alícuotas de las células se descongelaron en hielo y se utilizaron para transformar los productos de la ligación utilizando 210  $\mu$ L de células a las que se les adicionó el DNA ligado y se mantuvieron en hielo por 60 min. Se les dio un shock térmico de 2 min a 42°C, se colocaron en hielo al menos 2 min y se les adicionaron 800  $\mu$ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, glucosa 20 mM) y se incubaron con agitación (250 rpm/min) a 37°C por 60 min. Se colocaron 400 y 600  $\mu$ L de cada reacción en placas LB con 100  $\mu$ g/ mL de ampicilina y 40  $\mu$ g/mL de XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) y 100 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) y se incubaron a 37°C en estufa durante toda la noche. Se analizaron las colonias positivas y se realizó la extracción del DNA plasmídico por el método alcalino (Yepiz-Plascencia, 2000, Birnboim y Dolly, 1979, Birnboim, 1983, Sambrook y cols., 1989) para analizarse en electroforesis en geles de agarosa y secuenciarse.

Con el fin de obtener el extremo 5' del cDNA de la HDL-BGBP se utilizó la información depositada en el GenBank para un EST (etiqueta de secuencia expresada) de

camarón blanco similar a la BGBP de *P. leniusculus* (PvP 352 L99-29 *Penaeus* (Litopenaeus) *vannamei* cDNA similar a 1,3-Beta-D-Glucan-Binding Protein, mRNA dbEST 6347782, GenBank BF024091 y GenBank gi 11038221), el cual corresponde a la región del extremo faltante y se diseñaron dos primers específicos sentido HDL5UTRa y HDL5UTRb (5' TAT GGA AAC AGA TCT GGA AG AG 3' y 5' GAC ATT GAT AAC AGA GAG GAG C 3', respectivamente) y se utilizó el primer específico HDL5Minus (5' CCA GTA AGA GCC AAG ATC TC 3'), con los cuales se amplificó cDNA (600 ng de RNA total, es decir, 30 ng equivalentes de Poli A<sup>+</sup> sintetizados a cDNA) y genoteca de cDNA de hepatopáncreas (2 µl) con las combinaciones HDL5UTRa-HDL5Minus y HDL5UTRb-HDL5Minus. Se utilizó la reacción base de PCR y el programa básico anteriormente descritos. Los productos obtenidos se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1%, se purificaron con columnas de Qiagen para productos de PCR y se secuenciaron en la Universidad de Arizona.

#### Análisis de Secuencia de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos

Una vez que se obtuvieron las secuencias nucleotídicas, se examinaron para depurar la secuencia que pertenece al vector de clonación y únicamente se trabajó con la región que pertenece al inserto. Ya depurada, se procedió a buscar la identidad con las secuencias reportadas en las diferentes bases de datos y se utilizaron las facilidades de Internet del sitio NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>) y BLAST (Altschul y cols., 1990), en este programa se puede analizar la secuencia de interés (Query) contra las secuencias depositadas en GenBank (Subject). Además se utilizaron los programas DNASIS v 2.5 (Hitachi Software Engineering America, Ltd. Alameda CA, USA), BIOEDIT (Hall, 1999), Clustal X 1.8 (Higgins, 1992), LaserGene-DNASTAR (Dnastar, MD, WI, USA).

Para la caracterización de la secuencia deducida de aminoácidos de la HDL-BGBP se realizó un análisis bioinformático utilizando diferentes sitios en INTERNET,

como el sitio (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) para obtener número de aminoácidos, masa molecular, pI, composición de aminoácidos, predicción del péptido señal (<http://www.stepec-gr/synaptic/signfind.html>), presencia de sitios de glicosilación, fosforilación, índice hidropático, perfil hidropático ([http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/emp\\_2\\_prot.pl](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/emp_2_prot.pl)), gráficas de hidrofobicidad, hca (<http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/www-hca/hca-seq.html>), predicción de la estructura secundaria PSIPRED (<http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psiform.html>), estos análisis también se llevaron a cabo con la secuencia de BGBP de *P. lentusculus* (Cerenius y cols., 1994) con el fin de comparar si el comportamiento teórico de esta proteína era similar con la de camarón.

#### Northern y RNA blot

El RNA total de hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias de camarón blanco se aisló utilizando Trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina Gibco, BRL Life Technologist, Gaithersburg MD, USA), la cual es una modificación de las técnicas clásicas reportadas por (Chirwing y cols., 1979; Chomezynsky y Sacchi, 1987) y de un solo organismo de 15 g se disectaron los tejidos hepatopáncreas (1.13 g), músculo(1.15 g), pleópodos y branquias (0.24 g) utilizando tijeras y pinzas estériles. Los tejidos se colocaron inmediatamente en 1.5 mL de Trizol en un tubo falcon 2059 (14 mL de capacidad) y se homogenizaron en cama de hielo con un homogenizador automático Politrón PT-MR 2100 (Kinemática AG, Suiza), se homogeneizaron a 19,000 rpm por 1 min y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (15°C-30°C) con el fin de permitir la disociación completa de grasa, polisacáridos y material extracelular. Se adicionó 200 µL de cloroformo y se agitaron con vortex por 15 s y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 5 min, después se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos limpios a los que se les adicionó 500 µL de isopropanol, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4°C. El

precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se mezcló rápidamente en el vortex para centrifugarse a 7,500 x g por 5 min a 4°C. El pellet se secó al vacío en el Speed Vac (DNA Speed Vac, SAVANT AES2010, Holbrook NY, USA), con calor bajo por 10 min y el pellet se resuspendió con agua tratada con DEPC y se obtuvieron las concentraciones por absorbancia a 260 y a 280 nm usando un espectrofotómetro Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

La integridad de las muestras de RNA total de los diferentes tejidos fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1% con formaldehído (1 M) (Yepiz-Plascencia, 2000; Sambrook y cols., 1989) en buffer MOPS 1X (MOPS 0.02 M, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0 preparado en agua DEPC) y se dejó reposar 1 h antes de usarlo. Las muestras se descongelaron en hielo y se les adicionó un volumen igual de buffer carga para RNA (0.75 mL de formamida desionizada, 0.15 mL de MOPS 10 X, 0.24 mL de formaldehído, 0.1 mL de agua DEPC, 0.1 mL de glicerol, 0.08 mL de azul de bromofenol al 10%) se calentaron las muestras a 75°C por 20 min en baño de agua y se colocaron en hielo al menos dos minutos. Después se les adicionó 0.5 µL de bromuro de etidíó 1 µg/mL y se cargaron las muestras en el gel al que previamente se lavaron los pozos con el buffer de corrida, la electroforesis se llevó a cabo a 50 volts constantes hasta que la migración del azul de bromofenol llegó a ¼ partes del gel.

Veinte µg de RNA total de hepatopáncreas se analizaron en gel de agarosa desnaturalizante con 1 M de formaldehído (Fourney y cols., 1988) y fue transferido a membranas de nylon (Sequenase Images, Unites States Biochemical CORP, Cleveland OH) mediante vacío (VacuGene XL, Amersham-Pharmacia-Biotech, Suecia) siguiendo las instrucciones del proveedor y se fijó por tratamiento con UV (302 nm) por 5 min; como estándar de RNA se utilizó RNA ladder (Gibco BRL). El dot blot de RNA se preparó utilizando 4 µg de RNA total de hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias. Para marcar las sondas se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 700 pb utilizando los primers HDL1Plus-HDL2mínus (1270-1995 nt) y los primers HDL5UTRa-HDL5Minus (1-885 nt, descritos en pág. 24), se purificaron



utilizando las columnas de QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia CA USA). Se utilizaron 25 ng de estos productos y se marcaron por Random Primer Labeling System (Gibco, BRL) utilizando [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (Amersham-Pharmacia-Biotech, Sweden). Como control de gen constitutivo se utilizó el producto amplificado por PCR de la proteína ribosomal L21 de 524 pb ( 60S proteína ribosomal L21, GI 8888854 EST Pvb 592 L99-22 *Litopenaeus vannamei*), L21S (5' GGG GCT TCT TTC CCG TTT CAG C 3' ) y L21AS (5' AGA GCG AGG CCA GGA TGG AGC C 3').

Para los marcajes de las sondas se utilizaron 2  $\mu$ L de los primers HDL1Plus, HDL2Minus, HDL5UTRa y HDL5Minus (25  $\mu$ M) para las sondas de HDL y 2.5  $\mu$ L de L21S y L21AS (20  $\mu$ M) para la sonda de L21, 2  $\mu$ L de dATP 0.5 mM, 2  $\mu$ L de dGTP 0.5 mM, 2  $\mu$ L dTTP 0.5 mM, 5  $\mu$ L del [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP con una actividad de 10 mCi/mmol, 15  $\mu$ L de random primers (D.O, 260 nm 18 U/mL en HEPES 0.67 M, Tris-HCl 0.17 M, MgCl<sub>2</sub> 17 mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, BSA 1.33 mg/mL, pH 8.3), 2.5  $\mu$ L de DNA (25 ng de los productos de PCR amplificado con primers de HDL desnaturalizados previamente por calor a 100°C por 5 min), 1  $\mu$ L de Klenow (Fragmento Klenow de la DNA polimerasa) 2 U/ $\mu$ L (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), agua para ajustar un volumen de 50  $\mu$ L y se incubó por 60 min a 25°C en baño de agua. Transcurrido el tiempo se paró la reacción con solución stop. El DNA marcado se precipitó con etanol absoluto y se lavó el pellet dos veces con etanol al 70%, se secó con vacío y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua estéril. Se tomó 1  $\mu$ L de cada una de las sondas y se aplicó en filtros Whatman GF/A (VWR), se adicionó 5 mL de líquido de centelleo y se tomaron las lecturas en el contador de centelleo (LS Analyzer, v 3.1 A, 1988 Beckman Instruments).

La membrana de RNA se prehibridizó por 1 h a 65°C en una solución 5X SSC (20X SSC stock (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio dihidratado pH 7.0)), 5X solución de Denhardt (100X solución de Denhardt: (2% (p/v) albúmina de suero bovina, 2% (p/v) Ficoll y 2% polivinilpirrolidona), 0.1% SDS y 100  $\mu$ g/mL de DNA de espermatozoos de

arenque. Para la hibridización se utilizaron las sondas de HDL y L21 marcadas radioactivamente recién desnaturalizadas y se hibridizaron las membranas por 24 h a 65°C. Las membranas se lavaron con 2X SSC, 0.1X SDS por 15 min a temperatura ambiente, 2X SSC, 0.5% SDS por 15 min a 60°C, 0.2X SSC, 0.1% SDS por 30 min a 60°C y 0.1X SSC, 0.1% SDS por 1 h a 68°C. Se colocaron las membranas sobre papel filtro para retirar el exceso de líquido, se les envolvió en plástico autoadherente y se expusieron a película BIOMAX films (Kodak) utilizando un cassette con intensificadores (Cronex Lightning Plus T, Dupont, USA) a -80°C.

#### Análisis de Expresión del mRNA de la HDL-BGBP por Transcripción Reversa-PCR (RT-PCR)

Se utilizaron 20 µg de RNA total (aproximadamente 1 µg de mRNA) de hepatopáncreas, hemocitos, músculo, pleópodos y branquias de camarón blanco, los cuales fueron aislados como se describe anteriormente solo que en este caso se aisló también RNA total de hemocitos el cual se obtuvo de 5 organismos (15 g) a los cuales se les extrajo la hemolinfa usando aproximadamente 1 mL de hemolinfa por 2 partes de anticoagulante SIC-EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.3, en agua tratada con DEPC al 0.1%) según la técnica descrita por (Vargas-Albores y cols., 1993) y se colocó la hemolinfa en tubos de ensayo de vidrio libres de RNasas y pirógenos, se centrifugaron a 800 x g por 10 min a 4°C, se recuperó el paquete celular y se lavó con 500 µL de solución SIC-EDTA y se centrifugaron de nuevo por 5 min.

Una vez lavados se homogenizaron con 1 mL de Trizol y se obtuvo el RNA total siguiendo el protocolo para la extracción de RNA en otros tejidos (ver sección Northern y RNA blot). El RNA total de los diferentes tejidos fue tratado con DNase I (Gibco BRL, 1 U/µg de RNA) siguiendo las indicaciones de CLONTECH (Palo Alto, CA, USA): 1 mg/mL de RNA total (aproximadamente 50 ng de Poli A<sup>h</sup>) se llevó a un

volumen de 25  $\mu$ L con agua tratada con DEPC y se le adicionó un volumen igual de la siguiente mezcla: 1  $\mu$ L de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, 1  $\mu$ L de  $MgCl_2$  0.5 M, 22  $\mu$ L de agua estéril y 1  $\mu$ L de DNasa I libre de RNasa (1 U/ $\mu$ L) y se incubó 30 min a 37°C. Después de la incubación, se le adicionaron 2.5  $\mu$ L de EDTA 0.2 M y 2  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 para detener la reacción, se le agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min, separando la fase acuosa a la cual se le adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2.5 veces el volumen de etanol absoluto.

Se precipitó el RNA a -70°C por 30 min y se centrifugó a 12,000 x g por 30 min y se desechó la fase acuosa, el pellet se lavó dos veces con 200  $\mu$ L de etanol al 80% y se secó en calor medio por 10 min en el SpeedVac. El RNA libre de DNA contaminante se utilizó para sintetizar el cDNA siguiendo las indicaciones del fabricante (Gibco BRL). El RNA total se resuspendió en 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC y se le adicionó 4  $\mu$ L de Oligo dT 50  $\mu$ M (Perkin Elmer) y 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC (volumen final 30  $\mu$ L) y se incubaron a 70°C por 10 min, posteriormente se colocaron en hielo al menos 2 min. A esta reacción se le adicionaron 2  $\mu$ L de SuperScript II (200 U/ $\mu$ L), 10  $\mu$ L de 5X buffer de primera cadena (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ ), 5  $\mu$ L DTT 0.1 M, 2  $\mu$ L dNTP's 10 mM y 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC y se incubaron a 42°C por 50 min (volumen final 50  $\mu$ L). Se adicionaron 2  $\mu$ L de RNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 20 min. El cDNA se purificó utilizando 1/2 del volumen final de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se precipitó el DNA a -70°C por 2 h y se centrifugó a 12,000 x g por 30 min, se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se secó con vacío. El cDNA se resuspendió en 25  $\mu$ L (20 ng equivalentes de mRNA sintetizado a cDNA/ $\mu$ L).

Los cDNA de los diferentes tejidos se utilizaron para hacer las amplificaciones utilizando el programa HDL anteriormente descrito y los primers específicos de HDL-BGBP: HDL6Plus-HDL13Minus (5' TCA ATA TGG AAA TGA GCA CG 3' y 5' GGA AGC TGT AAT CCA CAT C 3', respectivamente), los cuales generan un

fragmento de 730 pb. Además se utilizaron como control de gen constitutivo primers específicos de actina- $\beta$  (GenBank AF300705) sentido (S) 5'TAC CTG ATG AAG ATC CTG AC 3' y antisentido (AS) 5' TAG AAG CAC TTC CTG TGA AC 3' (ActS-ActAS), los cuales fueron diseñados por el M.C. Arturo Sánchez, CIBNOR, La Paz, BCS y producen un fragmento de 564 pb. En esta amplificación se utilizó también los RNA (-RT) de cada uno de los tejidos para cotejar con la amplificación del cDNA y descartar cualquier producto de contaminación residual de DNA genómico en el material inicial. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, y se utilizó el sistema EDAS (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) para estimar la intensidad de las bandas y realizar un análisis semicuantitativo de las bandas amplificadas.

#### Extensión del Primer 5' (Primer Extension)

Para identificar el tamaño exacto del mensaje de la HDL-BGBP se empleó la técnica llamada Primer Extension (Sambrook y cols., 1989). Se utilizaron 3 primers antisentido de la HDL-BGBP correspondientes a HDL-Rv0 (133-158 nt), HDL-Rv1 (529-556 nt) y HDL-Rv2(676-701 nt) y se utilizaron mRNA (500 ng) y RNA total (5  $\mu$ g) de hepatopáncreas. Se probaron los 3 primers antisentido con mRNA y solo el HDL-Rv2 con RNA total. Primeramente se efectuó el marcaje de los primers con [ $\delta$ -<sup>32</sup>P] ATP ( $>5,000$  Ci/mmol) en la reacción: 1  $\mu$ L de primer antisentido 20  $\mu$ M, 4  $\mu$ L de 5X buffer cinasa (300 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M KCl) . 5  $\mu$ L de T4 polinucleótido cinasa (1 U/ $\mu$ L), 10.5  $\mu$ L de agua, 3  $\mu$ L de [ $\delta$ -<sup>32</sup>P]ATP (10 mCi/mmol), 37°C por 1 h, se paró la reacción con 500  $\mu$ L de TE y se procedió a adicionar 800  $\mu$ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente por vortex 20 s. Se centrifugó por 2 min a 12, 000 x g, se separó la fase acuosa y se realizó una extracción con 800  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por vortex y de nuevo se separó la fase acuosa. Se le adicionaron de nuevo 800  $\mu$ L de

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por vortex 20 s. Se centrifugó por 2 min a 12,000 x g, se separó la fase acuosa y se realizó una extracción con 800  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), luego se mezcló por vortex y de nuevo se separó la fase acuosa.

Se agregaron a la fase acuosa, 55  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 1 mL de etanol absoluto y se agitaron en vortex y se precipitó 1 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvo el pellet por centrifugación a 12,000 x g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante radioactivo y se lavó el pellet con etanol al 70 %, se desechó el sobrenadante, se secó el pellet al vacío y se resuspendió en 500  $\mu$ L de TE. Se tomó 1  $\mu$ L y se colocó en filtros Whatman GF/A (VWR) se adicionó 5 mL de líquido de centelleo y se tomaron las lecturas en el contador de centelleo. En un microtubo se mezclaron 2.5  $\mu$ L de RNA (5  $\mu$ g), 1.0  $\mu$ L de mezcla de dNTP 10 mM, 1.0  $\mu$ L de primer marcado (20  $\mu$ M) y 5.5  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  para tener un volumen final de 10  $\mu$ L se calentó a  $85^{\circ}\text{C}$  por 3 min e inmediatamente se colocó en hielo al menos 1 min. La reacción se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 h y hasta que alcanzó lentamente la temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

Se agregaron a la reacción 2  $\mu$ L de 10X buffer de transcripción reversa (RT, 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 4  $\mu$ L de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M y 1  $\mu$ L de inhibidor de RNasa recombinante y se mezcló suavemente con los dedos, se centrifugó brevemente. Se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 min y se adicionó 1  $\mu$ L de Superscript II (50 U/ $\mu$ L) se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 min, se inactivó la enzima a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 min, se centrifugó brevemente y se adicionaron 1  $\mu$ L de ribonucleasas: RNase H (2 U/ $\mu$ L, Invitrogen) y de RNase A (10 mg/mL, SIGMA) y se incubó la reacción a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min para eliminar el RNA y llevar a un volumen de 200  $\mu$ L con TE y realizar una extracción con 200  $\mu$ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por vortex 20 s, se centrifugó 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa fue colocada en un microtubo nuevo y se precipitó el cDNA con 50  $\mu$ L de acetato de amonio 10 M y 700

$\mu\text{L}$  de alcohol absoluto al menos 1 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se lavó dos veces con  $400 \mu\text{L}$  de etanol al 70% y se secó en el SpeedVac.

El pellet se resuspendió en  $20 \mu\text{L}$  de buffer de carga con formamida (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol FF, Amersham Pharmacia Biotech, Sweeden) y se mantuvieron en bloqueadores de radiación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida nativos al 7.5% utilizando TBE 0.5X ( TBE 10X: Trizma Base 39 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8.3) como buffer de corrida (precorridos toda la noche a 8 mA). Antes de cargar las muestras se calentaron a  $95^{\circ}\text{C}$  por 8 min incluyendo 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL) como estándar el cual se incluyó con tratamiento desnaturalizante con calor y sin calentamiento, además de incluirse el estándar con buffer de carga III (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol FF y 30% glicerol en agua, (Sambrook, 1989) sin formamida.

La electroforesis se llevó a cabo por 1.5 h a 35 mA hasta que salió el colorante azul de bromofenol, el gel se retiró de la cámara y se fijó por 10 min con ácido acético glacial al 10% y por 5 min con ácido acético glacial al 1%. Se retiró el ácido y se lavó rápidamente con agua destilada y se retiró con navaja el carril con los marcadores de DNA nativos, los cuales se tiñeron con una solución de bromuro de etidio en agua destilada ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). El gel se secó por 2 h a  $65^{\circ}\text{C}$  en un secador de geles con vacío (BIORAD) y se dejó alcanzar lentamente la temperatura ambiente, se expuso a película BIOMAX (Kodak films) utilizando un cassette con intensificadores a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se reveló utilizando reactivos KODAK una de las películas a las 24 h e inmediatamente se colocó otra película, la cual se reveló a los 30 días y la otra película se reveló a los 60 días de exposición. Las condiciones de revelado fueron las siguientes: revelado 10 min, lavado con agua 30 s, fijado 5 min y lavado 10 min con dos recambios de agua.

### DNA Genómico vs cDNA

Con la finalidad de identificar la existencia de posibles intrones en el gen que codifica para la proteína HDL-BGBP, se realizó un experimento comparativo entre las amplificaciones específicas utilizando diferentes combinaciones de primers utilizando DNA genómico obtenido de músculo de camarón así como cDNA de camarón blanco obtenido de hepatopáncreas y utilizando también el clon de cDNA pPvHDL3. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando la reacción base de PCR (descrita anteriormente) utilizando solo 2 µL de genoteca, 60 ng del plásmido pPvHDL3 y 100 ng de DNA genómico. Las combinaciones de primers y DNA templado utilizadas se muestran en la Tabla 2.

Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.2% de 15 x 15 cm, con el fin de comparar con la mayor resolución posible el tamaño de las bandas amplificadas con cDNA y DNA genómico.

**Tabla 2.** Combinación de primers y tipo de templado utilizados en la búsqueda de intrones en el gene que codifica HDL-BGBP de camarón blanco. Tamaño del fragmento esperado expresado en pares de bases (pb) según la longitud obtenida del cDNA

<b>Combinación de primers</b>	<b>Templado de DNA</b>	<b>Tamaño fragmento (pb)</b>
HDL5UTRa-HDL5Minus (1-866 nt) a	Genoteca DNA genómico	800
HDL5UTRb-HDL10Minus (299-1675 nt) b	Genoteca DNA genómico	1376
HDL1Plus-HDL17Minus (1290-2778 nt) c	pPvHDL3 DNA genómico	1488
HDL3Plus-HDL12Minus (2325-3195 nt) d	pPvHDL3 DNA genómico	870
HDL6Plus-HDL13Minus (3025-3755 nt) e	Genoteca DNA genómico	730
HDL8Plus-HDL7Aminus (3701-5200 nt) f	Genoteca DNA genómico	1499
HDL14Plus-HDL4Aminus (4442-5818 nt) g	Genoteca DNA genómico	1376

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Búsqueda de Clones de HDL-BGBP en el Banco de Genes de cDNA de Hepatopáncreas

Con el fin de encontrar los clones potenciales de HDL-BGBP se diseñaron primers específicos a partir de tres secuencias de la proteína: una correspondiente al amino terminal (*DAGQASLAGNFNSLR*) y dos secuencias internas (*IDINIADINPTS* y *SDGFETLEGNIKAK*) HDLNTS 5'GCCGCTCGAGGGNCARGCIWSIYTIGCNGGN AA YTTYA3', HDL5A 5'GCCGCTCGAGGGTTTATRTCNGCIA TRTTIATRTC3', HDL6A 5'GCCGCTCGAGGGCYTCIATRITNCCYTCNARIGTYTC3'. Estos primers inicialmente se diseñaron mas sencillos, no se incluyó la base Inosina y eran menos largos, sin embargo los resultados no fueron exitosos, por lo que fue necesario rediseñarlos adicionándoles las bases de anclaje de la enzima (GCCG) y el sitio de la enzima *Xho* I (CTCGAG) y la extensión de bases que provenían de traducción reversa a ciertas regiones de los péptidos amino terminal y dos internos de la proteína madura, los cuales se señalan en cursivas y negritas. El sitio de *Xho* I se incluyó pensando en obtener los fragmentos amplificados por PCR, digerirlos con esta enzima, de igual forma digerir el vector que sería utilizado para la clonación y ligar los insertos con la forma tradicional de clonación, pero finalmente se optó por clonar en el vector TOPO como se describió en materiales y métodos.

Se utilizaron dos combinaciones de primers HDLNTS-HDL5A y HDLNTS-HDL6A, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 480. En estas reacciones se probaron dos templados de DNA, cDNA de hepatopáncreas y también banco de genes de cDNA de hepatopáncreas en concentraciones ya descritas en la Tabla 1. Las reacciones se sometieron a análisis electroforéticos en geles de agarosa al 1% para ver los productos amplificados. En la Fig 1 se observaron dos bandas, una de ellas de aproximadamente 1.6 Kb (HDLNTS-HDL5A) y una banda de 1.8 Kb (HDLNTS-HDL6A). Se observan otras bandas pero de menor intensidad, debido a que el programa utilizado es de baja astringencia (considerando las Tm de los



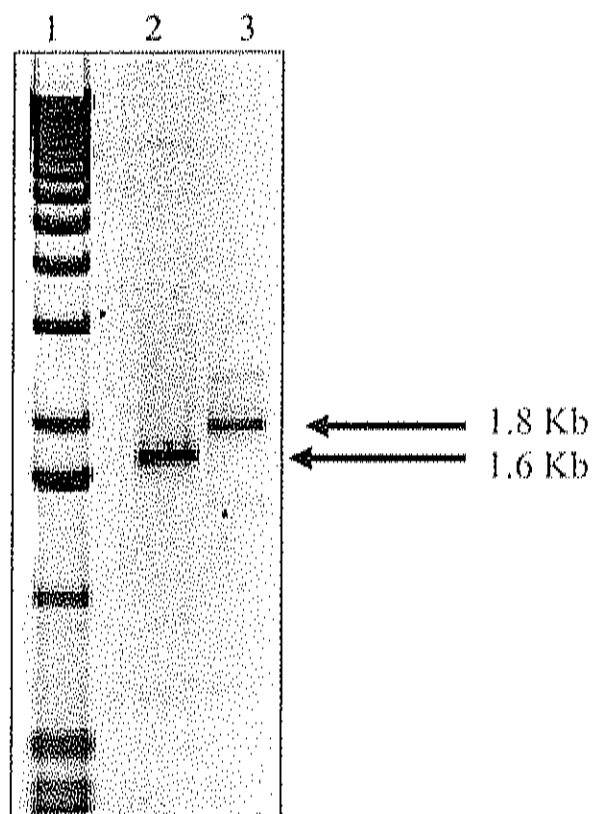


Fig 1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR. Carril 1, Estándares 1 Kb DNA Ladder; Carril 2, producto amplificado con la combinación de primers HDLNTS-HDL5A; Carril 3, producto amplificado con la combinación de primers HDL-NTS-HDL6A.

primers degenerados de HDL utilizados). Aquí cabe hacer la aclaración que el patrón de bandas obtenido fue constante cuando se utilizó como DNA molde el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas así como cDNA de hepatopáncreas preparado independientemente. Por cuestiones de cantidad de muestra se utilizaron únicamente las reacciones provenientes de la amplificación del banco de genes.

Una vez analizadas las reacciones por electroforesis, los fragmentos de DNA se utilizaron para clonar en el vector plasmídico pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup> TA Vector (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficiencia de transformación (plásmido control pUC18 10 ng/ $\mu$ L) fue de  $6.54 \times 10^5$  y se sembraron las colonias blancas (recombinantes potenciales) a medio líquido LB con ampicilina y se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989), posteriormente se digirieron con *Eco* RI, *Bam* HI y *Pst* I para determinar el tamaño del inserto, y se secuenciaron en LMSE de la Universidad de Arizona. Al analizar las secuencias y realizar una búsqueda en las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information con el algoritmo BLAST (Altschul y cols., 1990) se encontró similitud con un fragmento de la proteína BGBP de *P. lentusculus* (No. de acceso X80687). Los clones obtenidos fueron llamados pPvHDL1 (fragmento de 1.6 Kb) y pPvHDL2 (fragmento de 1.8 Kb), estos clones translanan en su región 5' ya que ambos tienen el mismo primer sentido, ambos tienen la secuencia nucleotídica que al ser traducida corresponde al N-Terminal de la proteína madura.

Al analizarlos en escala con el cDNA de *P. lentusculus* pudimos apreciar que los clones de camarón eran parciales, no contenían la región 3' y no presentaban la señal de poliadenilación por lo que se decidió utilizar el clon pPvHDL2 como sonda debido a su mayor tamaño. El clon fue digerido con la enzima *Eco* RI para liberar el inserto, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y fue purificado utilizando Gene Clean II (BIO 101, La Jolla CA, USA). El inserto purificado se marcó con DIG-dUTP utilizando primers arbitrarios como se describió anteriormente y se utilizó como sonda de DNA para realizar una búsqueda en el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas de camarón, con la finalidad de encontrar el clon completo de la HDL-BGBP.

La búsqueda se inició usando 250,000 ufp (50,000 ufp/placa petri de 150 mm x 15 mm), estas placas de lisis se transfirieron a membranas Hybond<sup>+</sup> y fueron hibridizadas con la sonda marcada con DIG, obteniéndose 32 clones potenciales de la HDL-BGBP distribuídos como se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Clones potenciales de HDL-BGBP del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas de camarón blanco

Placa	Clones Positivos	Clones Recuperados
1	6	1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5
2	14	2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5
3	5	3.1, 3.2, 3.3 y 3.4
4	3	4.1 y 4.2
5	4	5.1, 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5

Los clones recuperados se colocaron en microtubos estériles conteniendo 1 mL de SM para cluir los fagos al líquido y se les adicionó 40 µL de cloroformo con el fin de evitar el crecimiento bacteriano. Para realizar una segunda búsqueda, se utilizaron los clones que presentaron mayor intensidad en las membranas y únicamente se tomaron: 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, se siguió el protocolo anteriormente descrito y se obtuvieron los siguientes clones potenciales: 1.1.1, 2.1.1, 2.2.1, 3.1.1, 3.1.2, 3.2.1, 3.2.2, 4.2.1, y 5.1.1, los cuales se recuperaron y se utilizaron únicamente: 1.1.1, 2.1.1, 2.2.1, 3.1.1, 3.2.1, 4.2.1, y 5.1.1 para la búsqueda terciara, de la cual se obtuvieron los siguientes positivos 1.1.1 (8 positivos), 2.1.1 (10 positivos), 2.2.1 (negativos), 3.1.1 (1 positivo), 3.2.1 (negativos), 4.2.1 (1 positivo), y 5.1.1 (3 positivos) aislados y purificados.

Con los positivos potenciales 1.1.1.1, 2.1.1.1, 2.1.1.2, 3.1.1.1, 4.2.1.1 y 5.1.1.1 se utilizó la técnica ecisión *in vivo* para obtener colonias de las cuales se extrajo el DNA plasmídico (Yepiz-Plascencia y cols., 2000) que se caracterizaron mediante digestión doble con *Eco* RI y *Xho* I (Boheringer-Mannheim), estas enzimas delimitan el sitio

múltiple de clonación del vector pBK-CMV en el cual se construyó el banco de genes en el sistema ZAP Express. Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1% (Fig 2), en donde los clones presentaron el mismo patrón de restricción con pequeñas diferencias en la migración en una de las bandas. Claramente se aprecia la banda correspondiente al vector (4.5 Kb) y otras bandas de 3 Kb (que varía de 3 Kb a 3.5 Kb), una banda constante de 1.2 Kb y otra de 0.8 Kb.

Con este patrón se dedujo que todos los clones son iguales en el extremo 3' y difieren en el extremo 5', aquí hay que mencionar que la construcción del banco de genes es direccional con respecto a la orientación del gen insertado, de 5' a 3' y el sitio de restricción de *Eco* RI queda orientado al 5' y el de restricción de *Xho* I está orientado al 3'. Se digirieron por separado los clones provenientes de la ecisión *in vivo* con *Eco* RI y *Xho* I para confirmar los resultados obtenidos con la digestión doble y efectivamente los clones difieren en longitud del extremo 5'. Se decidió seguir trabajando con el clon 2.1.1.2 que presenta la mayor longitud, el cual fue también digerido con otras dos enzimas *Xba* I y *Pst* I (datos no mostrados). Este clon fue purificado, secuenciado y analizado con respecto a los clones pPvHDL1 y pPvHDL2 así como con la secuencia de cDNA de BGBP de *P. leniusculus*, el cual se llamó pPvHDL3.

#### Analisis de Secuencia de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos de HDL- BGBP de Camarón Blanco

##### **Caracterización Nucleotídica del cDNA de HDL-BGBP**

Para el análisis del cDNA de la HDL-BGBP se utilizó el algoritmo de BLAST (Altschul y cols., 1990) incluyendo todas sus variantes y la alineación de las secuencias parciales obtenidas del cDNA se realizó a través de Blast 2 Seq (los traslapes u overlapping) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast2seq/wblast2.cgi>) así como del uso del programa Dnastar (SeqMan) de Lasergene mediante el cual se logró obtener una secuencia consenso; principalmente se alinearon los cuatro fragmentos grandes de este cDNA: la región llamada HDL5UTR, pPvHDL1, pPvHDL2 y pPvHDL3 como se

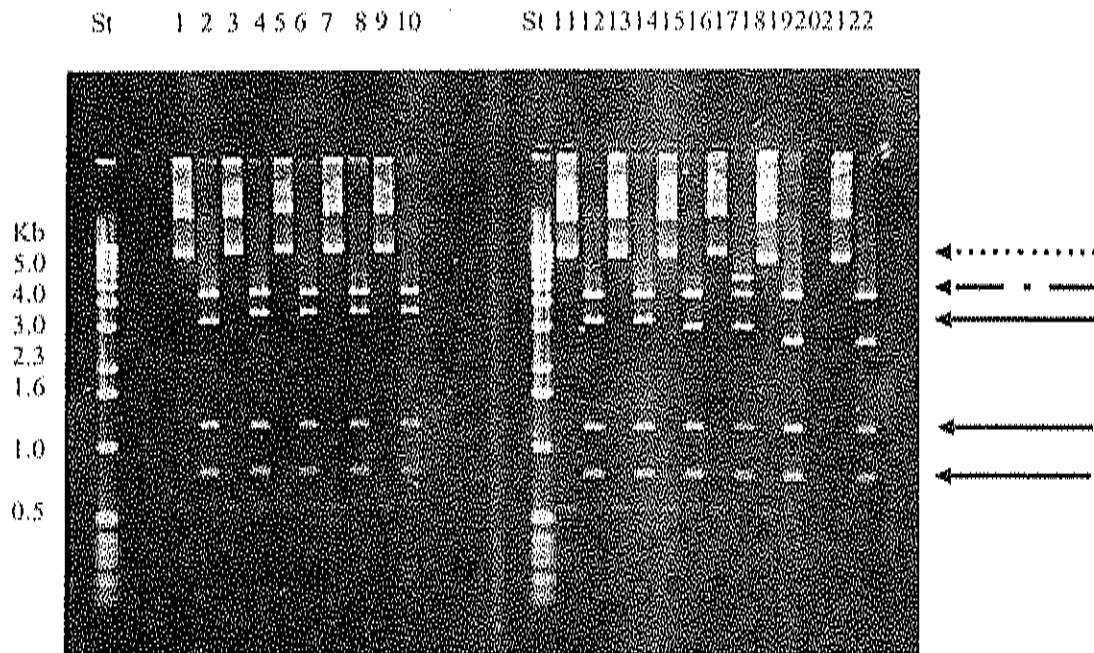


Fig 2. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1 % de los productos de digestión doble *Eco* RI/*Xho* I de los clones potenciales del banco de genes de hepatopáncreas. Carril St, Estándar 1 Kb DNA Ladder, Carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21, clones potenciales sin digerir; Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 Clones potenciales digeridos con *Eco* RI/*Xho* I. Los carriles denotados como 9 y 10 corresponden al clon 2.1.1.2 (pPvHDL3).

- ←..... Clon potencial sin digerir.
- ←- · - · Banda perteneciente al vector pBK-CMV.
- ←———— Bandas de digestión producidas por *Eco* RI y *Xho* I.

muestra en la Fig 3. La región HDL5UTR se obtuvo a partir de las ampliificaciones de banco de genes de hepatopáncreas y de cDNA de hepatopáncreas utilizando las combinaciones de primers HDL5UTRa y HDL5UTRb con el primer HDL5Minus como se describió anteriormente en materiales y métodos. En la Fig 4, se observa en el carril 2 la amplificación de una banda de 800 pb que corresponde a la combinación HDL5UTRa-HDL5Minus, en la cual se usó como DNA molde cDNA de hepatopáncreas, esta región corresponde al extremo 5' del cDNA de la HDL-BGBP y en el carril 3, se encuentra representada la misma combinación de primers usando como DNA molde el banco de genes de hepatopáncreas y no se observa la banda de 800 pb, por lo que concluimos que esta región no se encuentra representada en el banco de genes.

La eficiencia de la enzima SuperScript II (transcriptasa reversa) decrece con el tamaño del fragmento copiado, por lo que para este cDNA de la HDL-BGBP (6.38 Kb), esta región en particular pudo quedar truncada, que es lo que se observa en la Fig 4. Sin embargo, se observó la amplificación de un fragmento de 500 pb, que corresponde también al extremo 5' (300 pb corriente abajo) utilizando la combinación de primers HDL5UTRb-HDL5Minus en cDNA de hepatopáncreas (carril 4) y banco de genes (carril 5). Estos fragmentos amplificados por PCR fueron purificados por columnas QIAGEN (para productos de PCR) y secuenciados directamente.

La secuencia consenso del cDNA de la HDL-BGBP tiene 6379 nucleótidos (nt), con dos sitios potenciales de iniciación (ATG) que corresponde al aminoácido MET en las posiciones 49 y 625 nt; una región codificante que corresponde a la proteína madura de 3771 nt seguido del codón de terminación TGA, además presenta una región larga 3'UTR de 1967 nt con la señal de poliadenilación AATAAA a 12 nt corriente arriba (upstream) de la cola de poli A<sup>+</sup>; también se encontraron dos señales de desestabilización del mRNA caracterizados con la secuencia ATTTA en las posiciones 6142 y 6153 nt (Bernard y cols., 2001; Zhang y cols., 1999).

Específicamente esta región 3'UTR tiene una similitud a nivel de nucleótidos del 94% (546/578 nt) con una secuencia que corresponde a un EST (Expression

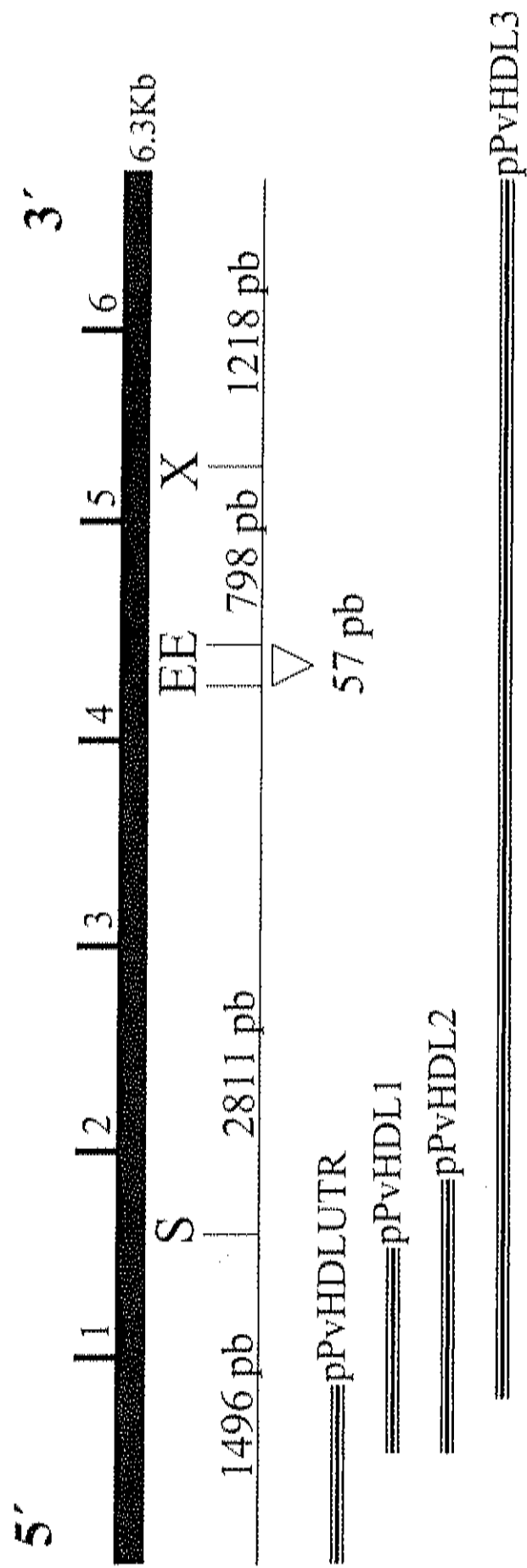


Fig 3. Esquema de barras del cDNA de la HDL-BGBP de *P. vannamei*, mapa de restricción y alineamiento de los diferentes clones obtenidos: pPvHDL5UTR, obtenido por PCR de la región 5'UTR, pPvHDL1 y pPvHDL2 obtenidos por PCR a partir de la genoteca de hepatopáncreas y pPvHDL3, obtenido como clon de cDNA a partir de la búsqueda en el banco de genes de hepatopáncreas de camarón blanco. Sitios de restricción seleccionadas: E: *Eco* RI, X: *Xho* I, S: *Sal* I.

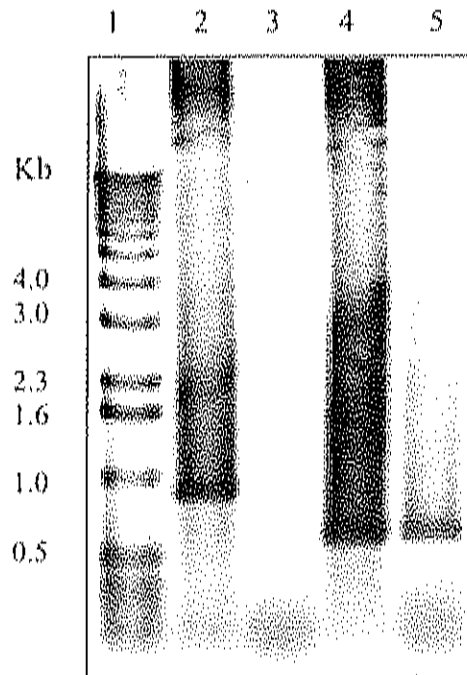


Fig 4. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. Carril 1, Estándar 1 Kb DNA Ladder; Carril 2, cDNA de Hepatopáncreas con la combinación de primers HDL5UTRa-HDL5Minus; Carril 3, banco de genes de cDNA de hepatopáncreas con la combinación HDL5UTRa-HDL5Minus; Carril 4, cDNA de Hep con la combinación de primers HDL5UTRb-HDL5Minus y Carril 5, banco de genes con la combinación de primers HDL5UTRb-HDL5Minus.



Sequence Tags, etiquetas de secuencia expresadas) PsP 471 L99-05 de cDNA de *Litopenaeus setiferus* (GenBank BF024578.1) depositada por Gross. La región 3'UTR que se reportó para *P. leniusculus* no es tan extensa (Cerenius y cols., 1994) y no hay similitud con la región 3'UTR de *P. vannamei* y *L. setiferus* por lo que se infiere que puede ser una región particular del género peneidos. También se identificaron las secuencias consenso repetidas (Tandem Repeats) a lo largo del cDNA (Benson, 1999) que posiblemente están relacionados con microsátelites específicos de ciertos géneros (análisis poblacional), como los que se han reportado para *P. vannamei*, en donde se ha reportado que el 7% de este genoma, consiste en tandem repeats (Bagshaw y Buckholt, 1997) y estos elementos repetidos se ensamblan a su vez en otras secuencias satélites y microsátelites, específicamente para *P. vannamei* se reportó la presencia de un pentanucleótido CCTAA, el cual está internamente incluido en la secuencia repetida. En la secuencia del cDNA de la HDL-BGBP, encontramos este pentanucleótido en las posiciones 1153, 1738, 6264 nt. Otra característica que encontramos en esta secuencia es que el pentanucleótido no se encuentra seguido por otro pentanucleótido como los casos reportados por Bagshaw y Buckholt (1997).

En la secuencia del cDNA de la proteína unidora de LPS en *Periplaneta americana*, se observó una larga extensión de 1503 nt en el extremo 3'UTR, presente entre el codón de terminación y el sitio de la cola de poli A<sup>n</sup>. Esta región presentó ciertas peculiaridades, contiene tres sitios de poliadenilación, sugiriendo mRNA's de diferentes tamaños. Entre las dos primeras señales de poliadenilación existen 15 "tandem repeats" sin ninguna sustitución y los autores no encontraron significado biológico. Además, la región contiene la secuencia TTATTTAT, y se encuentra conservada en las regiones 3'UTR de muchos cDNA que codifican para proteínas mediadoras relacionadas a respuestas inflamatorias en mamíferos, además se encontraron cinco regiones ATTTA, que están involucradas en la desestabilización del mRNA (Tufail y cols., 2001), en *P. vannamei* se encontró la secuencia TATTTAT en las posiciones (6141 y 6151 nt) y como se mencionó anteriormente también se encontraron las regiones de desestabilización del mRNA.

### **Caracterización de la Secuencia Deducida de Aminoácidos de HDL-BGBP**

La secuencia deducida de aminoácidos (aa) de la HDL-BGBP se obtuvo utilizando los programas DNAsis y DNASTAR así como las facilidades de algunos sitios en Internet (descritos en materiales y métodos). Esta secuencia (Fig 5), consiste de 1454 aminoácidos con un pI de 6.25 y un tamaño de 165.847 kDa (teóricos) para la proteína completa y de 1257 aminoácidos con un pI de 6.22 y un tamaño de 141.811 kDa (teóricos) para la proteína madura, tomando como referencia del aminoácido número 1 al ácido aspártico (D) del terminal amino de la proteína madura según datos experimentales ya reportados (Ruiz-Verdugo y cols., 1997; Yepiz-Plascencia y cols., 1998). Esta predicción del tamaño molecular de la HDL-BGBP contrasta con el dato obtenido experimentalmente, de ~100 kDa (Yepiz-Plascencia y cols., 1995; Yepiz-Plascencia y cols., 1998; Yepiz-Plascencia y cols., 2000a, Yepiz-Plascencia y cols., 2000b; Ruiz-Verdugo y cols., 1997 y Vargas-Requena y cols., 2002) estimado por SDS-PAGE, mientras que por espectrofotometría de masas se estimó un peso de 125 kDa (Vargas-Requena y Sotelo-Mundo, comunicación personal).

Esta diferencia puede deberse a modificaciones postraduccionales que sufre la proteína desde que es sintetizada hasta que es secretada a hemolinfa, además de la presencia de lípidos y carbohidratos (Yepiz-Plascencia y cols., 1995) que pudieran alterar la migración de la proteína en la electroforesis. Por otro lado, la identificación de bandas polipeptídicas de diferentes tamaños utilizando anticuerpos policlonales contra HDL-BGBP en extractos proteicos de hepatopáncreas de camarón blanco (Yepiz-Plascencia y cols., 2000a), entre los que destacan una banda muy fuerte de 40 kDa y bandas mas tenues de 140, 60 y 45 kDa sugiere también que existe un procesamiento en el hepatopáncreas antes de la secreción de la HDL-BGBP a hemolinfa. La detección de un polipéptido de 60 kDa por espectroscopía de masas además de la de 125 kDa en la proteína purificada, dato que concuerda con los de inmunodetección (Yepiz-Plascencia y cols., 2000a), podría sugerir un procesamiento adicional del péptido mayor, sin embargo, se ignora a que región corresponde este fragmento.

-197 M<sub>2</sub> S F D  
 1 TTGGACCTTATAAGTTTACCACCAACATTTCCCTACGCCAAATGATAAATATGTCCTTTGAT  
 -193 L T T P F D V I K T V S L S A R Y S W T  
 61 CTGACGACTCCCTTTGATGTTATCAAGACTGTGTCCCTTTCCAGCCCCGTACAGCTGGACC  
 -173 T S Q K G A T L N I T Y N D K N F V L S  
 121 ACCAGCCAAAGGGTGTCTACTCTAAACATCACTTACAATGACAAGAAGCTTTGTTCTCTCA  
 -153 S S L Q L S T R A S N I T F Q A T T P F  
 181 AGTTCCTCTGCAGCTCTCTACAAGGGCCTCTAACATCACCTTCCAGGCCACAAGCTCCCTTTC  
 -133 E G F Q N S F I E I K Y D I D N R E E L  
 241 GAGGGTTTTCCAGAAGCTCCCTTCATTGAAATCAAGTATGACATTTGATAACAGAGAGGAGCTC  
 -113 L A S R V S V D D H S Y S F V V G G Y J  
 301 CTTGCATCTCGTGTCTAGTGTAGATGATCACAGCTACAGCTTTGTTGTAGGTGGATATATT  
 -93 E D K L A V F K W N L N S P L T G W T D  
 361 GAGGACAAGCTAGCCGTGTTCAAGTGGAACTTAACTCTCCTCTCACTGGCTGGACTGAT  
 -73 A K F V A K I D L S S E N K N L E I S L  
 421 GCCAAGTTTGTAGCTAAGATTTGATCTTTCCAGTGAATAAAAACTTGGAAATCTCCCTT  
 -53 E K E G D L K A I A V S G K F I G S T L  
 481 GAGAAAGAAGGAGACCTGAAAGCCATTGCAGTCTCTGGCAAGTTCATTGGCAGTACACTG  
 -33 D F N L R T P F R G L N N F N V F G S L  
 541 GACTTTAATCTGCGAAGCTCCCTTTCCAGAGGGCTCAATAAATTTCAATGTGTTGGTTCTCTT  
 -13 N R S K R S L E M<sub>2</sub> R M M N D A G Q A S L  
 601 AACCGGTCCAAGAGGCTCTCTTGAATGAGAATGATGAATGATGCAGGACAAGCATCTTTA  
 8 A G N F N S L R F N M K T P F E R A E Q  
 661 GCTGGCAATTTCAACTCCCTCAGATTCAACATGAAGACTCCATTTGAAAGGGCAGAACAG  
 28 I S W E V T K T G E G S Y K A E W R R N  
 721 ATCTCCTGGGAGGTCAACCAAGACTGGTGAAGGCTCCTACAAGGCTGAATGGAGGAGGAAT  
 48 D N Y A T F T I E K D V S K Q S F D L N  
 781 GATAATTTATGCCACATTTACAATAGAAAAGGATGTAAGTAAACAATCCCTTTGATTTAAAT  
 68 I K S E F R G W E I L A L T G R L D Q E  
 841 ATAAAGAGTGAATTTCCGGGATGGGAGATCTTGGCTCTTACTGGAAGACTAGATCAAGAG  
 88 T K Q A Y L S G A I N E Q K I T V T G S  
 901 ACAAAACAGGCCCTACCTCAGTGGAGCCATCAATGAACAGAAAATCACTGTACCCGGATCA  
 108 G S I T N K I K F S M T I E T P Y E N Y  
 961 GGTTCATACACTAACAAAATCAAAATTCAGCATGACAAATGAAACTCCCTATGAAAATTAC  
 128 R Q V K A Q L N Y A K R K N A I K L E A  
 1021 AGGCAAGTAAAAGCCCCAAGTGAATTTATGCAAAAAGAAAGAACGCAATCAAAGCT  
 \* \* \* \* \*  
 148 S S S S S D F H L L W S R S G S G L E A  
 1081 TCTTCATCCCTCTTCTGATTTCCATCTTCTTTGGTCACGCTCAGGATCAGGCCCTTGAAGCC

168 H L I V P N S R Q N T E I S I N L T P T  
 1141 CACCTTATTGTACCTAATTCACGTCAGAATACTGAAATTTCCATCAACCTCACCCCTACT

188 Q G K I T I T S R F E P I R D Y L Q E Y  
 1201 CAAGGGAAAATAACGATAACATCACGATTTGAACTTATCAGGGACTACCTCCAAGAATAC

208 H V N L G Q N E I T A D H I I K L N G H  
 1261 CATGTTAACCTTGGTCAGAATGAAATCACTGCTGATCATATTATCAAGTTGAATGGTCAT

228 E V F K M D F E R N A P E Q K V H L E I  
 1321 GAGGTTTTCAAGATGGACTTTGAGAGGAATGCTCCTGAACAGAAGGTACACCTGGAAATT

248 H T H V A E R H T T I H F H R E G F S K  
 1381 CACACTCATGTAGCAGAACGCCACACAACATTTCACTTCCATCGAGAGGGCTTTAGCAAG

268 L N F L F K R E V P Q Y G E K H F K V D  
 1441 CTTAATTTCCCTCTTTAAACGTGAGGTTCCCCAGTATGGCGAGAAACACTTCAAGGTCGAC

288 I T G S G A L P Q K G A L D I V V E N T  
 1501 ATAACCTGGATCAGGAGCATTACCACAAAAGGGTGCACCTTGATATTGTTGTTGAGAACACC

308 F R E P A K T I N A R V E V D R T G A R  
 1561 TTCCGGCAACCAGCAAAAACCATCAAATGCACGTGTTGAAGTAGACCCGACTGGTGGCCCCA

328 K K I M L E V S P R Q S R V Y I F N L E  
 1621 AAGAAAATTAATGTTGGAGGTTTCTCCTAGACAAAAGTAGAGTATATATTTTTTAACCTTGAA

348 Y I A D L E S P Q H G D F T L K I T T P  
 1681 TATAATGCAGACCTTGAAAGCCCCACAGCATGGAGACTTCACATTA AAAATCACAACTCCT

368 N N S P W Q N I S G N W N V E D P N D A  
 1741 AACAACTCCCCATGGCAGAATATATCTGAAACTGGAATGTTGAAGATCCAAATGATGCT

388 T I T F T V G N V T Y N A K G K L T L R  
 1801 ACAATAACCTTTCACAGTGGGCAATGTTACTTTATAATGCCAAAGGCAAGCTTACTCTTAGG

408 E S T M I L S S T D P S A E N I Y L Q W  
 1861 GAATCCACCATGATACTCTCTTCAACAGATCCATCCGCTGAGAACATTTACCTACAGTGG

428 K F E R N G D T K D Y F L K L G R K S R  
 1921 AAAATTTGAACGAAAATGGTGCACACCAAAGATTACTTCCCTTAAGCTTGGCCGCAAGTCCAGA

448 Y G M L K L T G T I T D I A H V D I E G  
 1981 TACGGAAATGCTGAAGCTGACAGGAACAATTAACGGATATTGCTCATGTGSATATTGAAGSA

468 G F R A G P F M P N E F L F T S M W G K  
 2041 GGCTTCAAGGCTGGACCATTTCATGCCAAAATGAGTTTCTGTTTACCTCTATGTPGGGGCAAG

488 S N G V V T G E G T F D Y G N Y H G S H  
 2101 TCTAATGGTGTGTTCACTGGAGAAGGTACATTTGACTATGGAAACTATCACGGCTCCCAC

508 R L V K F E R N A E R K S A S F E W S A  
 2161 CGTCTGGTAAAGTTTGAGCCGAAAATGCAGAAAGGAAATCAGCATCCTTTGAATGGTCAGCA

528 T S N I P Q Y N S V S V S G N Y D F N H  
 2221 ACTTCAAATATTTCCCAATAACAACCTCTGTCTCAGTTTCAGGAAATTAATGACTTTAACCAC

548 K V V I F V V I N A D G R E S K I D I N  
 2281 AAAGTTGTATCTTTGTCCTCATAAATGCTGATGGTAGAGAATCT'AAAATTGATAATCAAC

568 I A D I N P T S S R N T A M I S I P L L  
 2341 ATTGCTGATATCAACCCCAAGCTCTCGTAATACAGCAATGATTTCTATCCCCTCCTA

588 G P T F K R T E L T V S H D F S H P N R  
 2401 GGACCTACATTTAAAAGAACAGAACTCACTGTCAQCCATGACTTTAGCCATCCAAACCGA

608 K S I S A V A K F G R S E S F I N A K W  
 2461 AAATCTATCTCAGCTSTTGCCAGT'TTGGTCGCTCAGAATCCTTCATCAATGCTAAGTGG

628 N R S D G F D T L E G N I E A K S R F L  
 2521 AACCGAAGTGATGGTTTTGATACTCTTGAAGGAAATATAGAGGCCAAGTCTAGATTCCCTT

648 G D F L I N V R Y D M S N I A D A H A E  
 2581 GGAGATTTTCAATCAACGTCAGGTACGACATGTCCAATATTGCAGATGCTCATGCTGAA

668 V D Y L R T T T D G D K K E F K L N W T  
 2641 GTTGATTTAATAAGAACGACAACAGATGGTGATAAGAAGGAATTTAAGCTAAACTGGACT

688 R K S T D D H L E N E M V F D S N F E T  
 2701 AGGAAATCCACTGATGACCATCTTGAATAATGAAATGGTCTTTGACTCCAACTTTGAGACC

708 L S H A R A Y A N A D Y G G I F K L L S  
 2761 CTGTACATGCCCCGTGCATATGCCAATGCTGACTATGGTGGCATT'TTCAAATTTGTATCT

728 G L D W D D K K I S L T L E V R K N K I  
 2821 GGGTTGGATTGGGATGACAAGAAAATTAGCC'TTACCCTCGAAGTTTCGCAAAAACAAGAT'T

748 S G I L T T P F E G F E T L E I D L Q Y  
 2881 TCTGGAATACTTACCACACCATTTTGAAGGATTTGAAACACTAGAGATTGACCTGCAGTAT

768 K L T G K D K S V K A T Y Q (R G D) R K A  
 2941 AAGCTTACTGGCAAGGACAAGT'CACTTAAAGCAACA'TATCAACGGGGAGATAGGAAAGCC

788 S F N M E M S T K G K K G G S F K V D L  
 3001 AGTTTCAATATGGAAATGAGCACGGAAGGGTAAAAAAGGAGGCTCCTTTTAAAGTTGATCTC

808 T T P F E V V K N L H I D G Q Y E N K V  
 3061 ACTACACCTTTTGAAGTGGTGA AAAACCTTCATATTGACCGTCAATATGAAAAATAAAGTG

828 A Q I N Y Q R N D I Q M N F N G K A N I  
 3121 GCTCAAATTAATTACCAGAGAAACGATATTCAAATGAACTTCAATGGAAAGGCCAACATC

848 K S S K A S F D I S F T P P S G Q N I R  
 3181 AAGTCCAGTAAAGCTTCCTTTGACATTTCAATCACACCACCTAGTGGACAAAAATATCAGG

868 I A A S Y D V Q D F I D G T G D E E K E  
 3241 ATAGCAGCCTCATATGATGTACAGGACTTCAATTGATGGTACAGGAGATGAGGAGAAGGAA

888 L A S L S L E F E G N S M D F S L H G F  
 3301 CTAGCTAGTCTTTCACTTGAATTTGAAGGTAATTCATGGACTTCACTTTCACGGCTTC

908 R N D D R L Y V M I H G T S S P A V L K  
 3361 CGCAATGATGACAGACTCTATGTATGATTCATGGCACTTCCTCCTTTGCAAGTGTCTCAA

920 M F H L K L D S E L N T E A R D G T F E  
 3421 ATGTTCCATCTCAAATTAGATTCTGAACTGAATACAGAGGCCACGGGATGGCACTTTTGAA

948 L T F N D F K F N V S N H F E R R A N N  
 3481 CTCACCTTCAATGATTTTAAATTCAATGTAAGCAATCATTTTGACAGACGAGCAAATAAT

968 G Y Y F R S K I E S T L T P L P A L I I  
 3541 GGTATTACTTTAGAAGCAAGATTGAGTCTACACTCACTCCACTCCCAGCACTGATCATT

988 G L G R E G Q E R I I T I G Y G E D K E  
 3601 GGTCTTGGTCTGTAAGGTCAAGAACGCATCATAACCATTTGGTTATGGAGAAGACAAAGAG

1008 I T F S V K G K N N F L E G F S G K V D  
 3661 ATCACCTTCTCTGTAAAAGGCAAGAACAACCTTCTCTCTGGATTTTCGGGCAAGGTTCAT

1028 I P S I G Y E G V E Y D V D Y S F P G D  
 3721 ATTCCCTCCATAGGTTATGAAGSAGTGGAAATATGATGTGGATTACAGCTTCCCAGGTGAT

1048 N H L Q I K V E I D L N E N G Q E V E A  
 3781 AATCACCTCCAGATTAAAGTTGAGATTGACTTAAACGAGAACGGACAAGAAGTGGAGGCA

1066 T F F L D S E G I K A R L S S A V L G D  
 3841 ACATTCCTTCCGATTCAGAAGGTATCAAGGCTCGCCCTGTCATCTGCTGTGCTTGGTGC

1088 H S L R V R R S V A P D G F Y A E A G L  
 3901 CATTCCCCTGGTGTTCGTGATCAGTGGCCCCTGATGGCTTCTATGCTGAAGCTGGTCTT

1108 D D Y N L K L R G G F K N E D T A R G V  
 3961 GATGATATAAACCCTGAAACTGCGAGGAGGCTTCAAGAACGAAGATACAGCACCTGGTGT

1128 Q L E G E V F G K R F L I D T L F Q S E  
 4021 CAGCTGGAAGGAGAAGTATTTGGTAAGAGATTCCCTTATTGACACCTTGTTCAGTCTGAA

1148 G K R Y S E G K L I I H T P F H G M E K  
 4081 GGAAAGCCCTATTCTGAGGGTAAACTTATCATCCACACTCCATTCCATGGCATGGAAAAG

1168 M G G L F T W S N Q N K K I M A H A E L  
 4141 ATGGGTGGCCTATTACCTGGTCTAATCAAAACAAGAAAATCATGGCCCATGCTGAAC

1188 H L P S Y T T P T I T G E I S L D L K K  
 4201 CATCTTCCCTTCTACACAACACCAACGATTACTGGGGAGATTAGCCTAGACCTTAAAAAG

1208 K I N G Y V T L D V A G E E F T L K C N  
 4261 AAGATCAATGGATATGTCACCCCTTGATGTAGCTGGAGAGGAATTCACCCCTCAAGTGCAT

1228 L A G S S I S Q G Y T G S L B F Y T T I  
 4321 CTTGCTGGTTCCTCCATTTCTCAGGGTTATACAGGCTCACTTGAATTCATATACGACCATT

1248 P C C I T C C G D R \*  
 4381 CCATGCTGTATCACATGTTTGTGGTGACCGGTGACATTA AAAATGCAGGCATTTGTCCTTCCCT  
 4441 CGACATGNAAGTAAAATTGATGCCCTTTTGGCCACACACGACCCCTTAAACTGAAAATACCA  
 4501 GCTCAGTGCTGACAAAAGTGTGAAGAAGCCCTTCCCTCAGTCAACAAGGTGTATATAATACC  
 4561 ATTCAGCTAAGCCCTTAACTTCAAGGCCCTCAGTACTGGAAAATGTAGAGGCCCAACTTGAAT  
 4621 GTCAATGACAACAAGATTAAACCCACATTACACTTTGGCACAATCCACCTTCAAATTTGAC  
 4681 GTAAGAACAGTCAATTTTTGGCAAGGAACGCCAGTTCTCCATTGAAGCTAAGTATCCATCT  
 4741 CTGGAGAACTTCCAGGGTGTAGTTGCTGTACTCTGGAAAGGTGAAAAGCCACATGGTTAGT  
 4801 GGAAGCCTGAACATCGTTAACAATCGCATCCAAGGAGCTATGGATTTCGAAATCTGATCTT

```

4861  ATTGAGGGGGCCACGGAAACTGGTCTTCGATGTTTCCATGCCAACTGCCTTCCTATAAGCAA
4921  GTCFCATGTAATATCGTCTTCACTAGCAATGACCCCTCACTCCCTTCTACCTGGATTTGGAT
4981  CTAAGAAGCTGGGCCTCAAGCTACTGTAAAGATTGATACACCCGCTCTCCCGAAAGTTACC
5041  ACTACCCCTGCAAGTAGCCCCCTGCTGTTGCTGGAAATCACCATTGAGACCCCAAGGAACA
5101  CACAAGGTTTCAGCTTAGCTGGCGCCAGACTCTGTAGAATGCCGTCTGACTGGATTTGCTTCC
5161  CTCGAGCTGATCTCTCCATTACTGCCGTGAGAACTACCTCTTCAGTGTAAACCTTGGAAAGT
5221  AAACACATCAAGGCTGAGCTGCAAAACAGGAAGCATAAAGCACGCTCTTGAGGCAAGGACC
5281  TCAGTGTCTAACTATGGAGGTGAATTTGCTCTCATGATTTGACACACCTTTTGAAAATATC
5341  AACAAAGTTTACACTTTGATGSCCTCACTCAACTTCCAGAACAAATGTTGAGATGTATATCACA
5401  GCCAACTTTCCCAACACTGTCAATTCCTTCCGGTTCAATTTGGACAAGGAAAACAGGAAG
5461  TTCTGTCAGCATTTGTGGAATCTCCATACCGTTCCCAACAGGAATGGCTGAAGCTGAAGCTAT
5521  GCTCACAGGAAATACAAAGAACATGCAAAATGAAGATGGCATTGAAGAATGCTGAAGACAC
5581  CATCTCTGGAACTCCCAACGTTAAGATCGAATCTTCCACAGAATGTGAGTACCAACCTCAA
5641  GATTCCTTACGCCATTTCAAGGGTTACAAGAAGATGAACCTTCGGTGGCCCGCTACCTTAAAGA
5701  TGAGGTTGACCAACATTTCCGGTGTATGCCGACAAGCCCTCTCAAGTTTAAGGCAAGAACTT
5761  CAGTTTGGAAACACCGAGGATGCCGTGGCAGCCAACTTGGTTGTTGAAACTCCCATCGAA
5821  GACTTCGAGAGGATCGAAGCCCAAATGAAGGTCCCTCTGTACAGGTTTGTCTCCCAAGGTGA
5881  TGCTGACTCTCCCTCACAAACCGCTACGGTTTACCAGCAGATTTATGACAGCGACTCTTTCT
5941  CTCAGAAGTTGTCTGCTGGCCGCTACGGTGAACGAAGAGTCTGATGACCGGATACTACTCTC
6001  TGAGAACAAGGCACCTTACGAGCTGGCTTACGGCTACGACTTCCCTCACTTGGCAAGCA
6061  CGCGTTTCCATCTTAGACCGACTCGTCAATTCCTTCCGCTGTTTGCATAAATTCGGTGATTT
6121  TGTTTGAAGACACTGATGTGTATTTAATGCGTAATTTACTAACTACATTCACGGCATCTAG
6181  TCAGATCGAAACCAATTATACAATATGACATGAACAAAACCAATTCCAAATATATTAACA
6241  ATTACCAAGAAATGTGAAACTGTGCTTAAACATTCCTAGGCTCAACAATTTTGACAATCTT
6301  ACCTTATATGTATATAGATATTCATGATTTGTGACATGTATCACCAAATAAAGAAATTTTAA
6361  AAAAAAAAAAAAAAAAAA+++

```

Fig 5. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos del cDNA de la HDL-BGBP de *P. vannamei*. La secuencia del terminal amino y las regiones internas de la proteína madura obtenidas por proteólisis se denotan en negritas, cursivas y doble subrayado. Los sitios potenciales de inicio se denotan con M<sub>a</sub> y M<sub>b</sub>. Los sitios de glicosilación están en negritas y subrayados. Los potenciales sitios de fosforilación (poliserina) están denotados con asteriscos. Los sitios potenciales de corte para procesamiento postraduccionnal están subrayados. La región RGD está en negritas y entre paréntesis. Los sitios similares a región glucanasa está subrayado y en negritas. La señal de desestabilización se denota subrayado punteado, la señal de poliadenilación se denota con (") y la poli A+ se denota con itálicas y (+).

Además de las lipoproteínas plasmáticas no asociadas al sexo, se han reportado las lipoproteínas específicas de hembras reproductoras y que son llamadas vitelogeninas (Vg's). Las Vg's, las cuales son los precursores de la proteína del huevo, vitellina (Vn) en la mayoría de los animales ovíparos invertebrados y vertebrados es sintetizada extraovariamente y secretada a la hemolinfa para incorporarse a los oocitos. Durante este proceso, las Vg's y Vn's son modificadas por glicosilación, lipidación, fosforilación y digestión proteolítica (Tufail, 2000; Chen y cols., 1999; Hirai y cols, 1998). Es posible que en la HDL-BGBP ocurran procesos similares a las de las vitelogeninas, ya que también es una proteína que contiene lípidos, carbohidratos (principalmente glucosa y manosa) (Ruiz-Verdugo y cols., 1997, Yepiz-Plascencia y cols., 1995, Yepiz-Plascencia y cols., 1998) así como sitios potenciales de glicosilación, fosforilación, miristoilación encontrados en la secuencia deducida.

En el análisis de la secuencia deducida de las vitelogeninas en la cucaracha, *Periplaneta americana*, se reportó que existen siete sitios potenciales de sitios de corte post-traduccionales R(K)/XX/R(K) (Tufail y cols., 2000), mientras que para la chinche del frijol, *Riptortus clavatus*, se reportaron cuatro sitios de reconocimiento para endoproteasas dibásicas como los de la familia de la subtilisina. También en mosquito, *Aedes aegypti*, se ha observado este procesamiento de la pro-Vg el cual es inducido durante la vitelogénesis (Hirai y cols., 1998).

La VI del langostino, *Macrobrachium rosenbergii*, está constituida por dos polipéptidos A y B, los cuales son producto de una modificación post-traducciona del mismo gen y por consiguiente derivan del polipéptido común, E en donde se encontró un sitio RQRR justo antes del sitio de iniciación del polipéptido B cerca del terminal carboxilo (Chen y cols., 1999). En la secuencia deducida de HDL-BGBP de *P. vannameli*, se encontraron dos posibles sitios de hidrólisis postraducciona: el primero situado en la posición de los aminoácidos -12 al -9 (RSKR), el cual es seguido por una secuencia de SLEM<sub>6</sub>RMMND<sub>1</sub> (-8 al 1). El ácido aspártico es el primer aminoácido del amino terminal determinado experimentalmente (Ruiz-Verdugo y cols., 1997 y Yepiz-Plascencia y cols., 1998) ya que esta secuencia (-8 al -1) después del sitio de corte no



aparece en la secuencia del extremo amino, es probable que estos residuos sean removidos por otro tipo de procesamiento como se observó en *Bombyx mori*, en el cual se removieron cuatro residuos después del sitio de corte RXXR (Tufail y cols., 2001 y Yano y cols., 1994). El segundo sitio se encontró en la posición de los aminoácidos 1091-1094 (RVRR) cercano a la región del terminal carboxilo y si tomamos en consideración el sitio último de corte, el tamaño estimado de la proteína modificada es de 123.84 kDa, lo cual concuerda con los datos de espectroscopía de masas.

Claramente se observa una extensión de 197 aminoácidos previa al primer aminoácido de la proteína madura, en la cual se presentan dos sitios potenciales de iniciación correspondientes a la Met<sub>a</sub> (-197) y Met<sub>b</sub> (-5). En esta secuencia no se encontró la región característica a un péptido señal: Met inicial, aminoácido básico (Arg o Lys) y aminoácido del tipo hidrofóbico (principalmente Val y Leu) y al ser analizada utilizando el programa SIGFIND, no se encontró una región que pudiera ser identificada como péptido señal, lo cual es contradictorio para una lipoproteína que se sintetiza y secreta hacia otros tejidos, que debe de tener este tipo de señalización. En la caracterización del cDNA de BGBP de *P. lentusculus*, Cerenius y cols. (1994) no lograron identificar la región del péptido señal y asignan la Met inicial a la Met que está mas cercana al Asp del terminal amino y tiene una secuencia circundante MMN, también encontrada en *P. vannahmei*; en *P. lentusculus* existe otra Met (-109) en la secuencia previa al amino terminal como se observa en *P. vannahmei* y hasta el momento estas dos secuencias son las únicas reportadas para proteínas del tipo HDL-BGBP.

Si se analizan las secuencias reportadas para otro tipo de proteínas de reconocimiento de 1,3- $\beta$ -glucanos ( $\beta$ GRP), el cDNA del gusano de la seda, *Bombyx mori*, (Ochiai y Ashida., 2000) tiene un péptido señal característico: MYKRCVWVLLDKIDLC así como la señal típica previa al amino terminal del gusano del tabaco, *Manduca sexta*, (Ma y Kanost, 2000): MLKSVFVFLVNYLNSVRC, mientras que para las proteínas unidoras de lipopolisacáridos y 1,3- $\beta$ -glucanos (LGBP's), caracterizadas a partir del cDNA de hemocitos de *P. lentusculus* (Lee y cols., 2000), la secuencia péptido señal es: MRALCFLLLACGALA y en el camarón tigre,

*Penaeus monodon*, (Sritunyaluksana y cols., 2002) se reportó como péptido señal: MKGFVASVLLACGALA. Recientemente se reportó la secuencia del cDNA de una LGBP que su síntesis en hepatopáncreas se ve aumentada en respuesta a la infección del virus de la mancha blanca en *Penaeus stylirostris* (Roux y cols., 2002) y la secuencia señal es la característica: MKTVLLSLSTMKGFVASVLLACGALA.

La secuencia deducida de la HDL-BGBP se analizó usando los diferentes programas accedidos a Internet, ya descritos anteriormente, y se predijo la composición de aminoácidos de la proteína madura, la cual resultó similar a la reportada por (Ruiz-Verdugo y cols., 1997) donde se observaron 189 residuos cargados negativamente (Asp + Glu) y 175 residuos cargados positivamente (Arg + Lys), se estimó una vida media de 30 h y un índice de estabilidad de 29.33 la cual la cataloga como una proteína estable, presentó un índice alifático de 73.96 y un promedio de hidropaticidad (GRAVY, por sus siglas en inglés Grand Average of Hydropathicity) de -0.534. Se encontraron diferentes sitios potenciales de glicosilación: O-glicosilación en las posiciones 187 (T), 980 (T), 415 (S) y 1191 (S); N-glicosilación concenso típico N(P)(ST)(P), en las posiciones aminoacídicas de 374 (NISG), 395 (NVTY), 628 (NRSD), 685 (NWTR) y 956 (NVSN).

También fue posible identificar 23 sitios potenciales de fosforilación con una probabilidad de confianza mayor al 90%, lo cual la hace potencialmente una fosfolipoglicoproteína, aunque esto no se ha demostrado experimentalmente, otras lipoproteínas como las Vg's de insectos son secretadas como fosfolipoglicoproteínas después de sufrir modificaciones postraduccionales. En el mosquito, *Aedes aegypti*, existen regiones poliserinas que son fosforilables, se ha reportado además que, la remoción de los grupos fosfatos reduce la afinidad de la Vg a su receptor (Hirai y cols., 1998). En la fosvitina de vertebrados, una Vg, también contiene una región poliserina con la mayoría de los residuos fosforilados; y la defosforilación de la fosvitina disminuye la entrada a los oocitos (Hirai y cols., 1998). En *P. vanuamei* se logró identificar una región poliserina KLEASSSSSDF (144-152) en la cual tres serinas son potencialmente fosforiladas con una confiabilidad arriba del 95%.

En la comparación de la secuencia deducida del cDNA de HDL-BGBP de *P. vannamei* con la secuencia deducida del cDNA de la BGBP de *P. leniusculus* (X80687), se encontró una identidad del 54% y este valor aumenta a 73% si se consideran los residuos conservados (Fig. 6). Hasta el momento, esta es la única proteína de este tipo reportada, y tiene otras regiones importantes como las regiones del tipo glucanasa y una región del tipo integrina conformada por los aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD); la región RGD está involucrada en las actividades de unión celular y esta región consenso inicialmente se propuso como arginina-glicina-aspártico-serina (RGDS), sin embargo se observó que el residuo serina jugaba un mínimo papel –si es que alguno- en la unión con las células así que únicamente se asignó a la secuencia RGD como sitio activo (Ouaissi, 1988).

En *P. leniusculus*, la presencia del triplete RGD no fue suficiente para la unión de BGBP al receptor de hemocitos y se ha propuesto que se requieren otros dominios de la proteína para estabilizar la unión y activar al sistema de la profenoloxidasas (Cerenius y cols., 1994). Recientemente se publicó que la región RGD no es necesaria para la asociación con las membranas plasmáticas, cuando se estudió la asociación *in vivo* de proteína unidora del factor de crecimiento similar a insulina-2 (IGFBP-2, por sus siglas en inglés) utilizando ratones transgénicos que presentaban la región Arginina-Glicina-Glutámico (RGE) en lugar de la normal RGD y no se modificaron los efectos inhibitorios de crecimiento por el IGFBP-2 (Hoefflich y cols., 2002).

Predicción de la estructura secundaria de la HDL-BGBP. La secuencia peptídica deducida de la HDL-BGBP de *P. vannamei* (proteína madura) fue analizada para predecir la composición estructural. La proteína presenta 10.5 % de hélices alfa, 50.2 % de hojas beta y un 39.3 % de vueltas, estos resultados son similares a los datos reportados por Vargas-Requena y cols., (2002): 20 % de hélices alfa, 53 % de hojas beta y 27 % de otras estructuras. Además el análisis comparativo con HDL's de otros invertebrados indica que estas proporciones se mantienen; HDLp (Lipoforina de alta densidad) de *Manduca sexta*: 34 % de hélices alfa, 47 % de hojas

HDL-BGBP -197 MSFDLITTPFDVTKIVSLIARYSWTTEOKGATINMAYNDINEMLSSEIQLISURASNLITROA  
 BGBP 1 -----

HDL-BGBP -137 TTPFEGFONSELEIKYDIFDNREELQASRISVDDHEYSVYVCGVIEDYKAVKKNLNSPIT  
 BGBP -109 -----MITGKDYVNEVYPTVIEDIKVAYEKCSLMSPLP

HDL-BGBP -77 GWTDAKQVAKIDLSEENKMFISLIDKGDICATAKGRFICETIDNLEPPREGLNPNV  
 BGBP -76 GWTSAKIEVRYDPSQDKIIEISVERKGNKATAKSGIKGSIYDRLTAPYGLKNLAV

HDL-BGBP -17 FGSLNRSKRSLMEMMNDAGQASLAGNENLRFNRCQDTPVADQREWEVYRTGEGEYKAE  
 BGBP -16 FGSLNRAKRSLEFMMNDAGEASLVTNENSAKLEKCPDVAVREWEVYRVNENENYKAE

HDL-BGBP 43 WRNDNYATFTLEKQVSKQSPFLNKSEFRQWEKALATGKLDQETKQAYSGATNEQKKT  
 BGBP 42 WRNNNYVDASLEKQGRSRAFLNKSEIQWEKALATGKLDQEDLQEVLEGATNEEKKT

HDL-BGBP 103 VAGSGSITNKIKFVYTIETPYENYRQVKNQVYAKKNAKLPASSSSSSPHLYSRSQ-  
 BGBP 102 NSIQGRHDVEGETKQNYTTPYENYRTVECKLVYSLRNQKLPASSSSSSPHLYKRYKR

HDL-BGBP 162 SCQEAHLIVPNRQNTETSLNLTPTQGGKTTISRFEPHEDYLOEYVNEGQNETADRII  
 BGBP 162 NQVTSILIVPNARPTPNSLSPSMLWREKIAFTSETEARINSHHEVYVTC-DIKFSDKT

HDL-BGBP 220 KINGHVFKMDFERNAPQKHLIEHTVAERETTFPFRGGSKLNFELKGRKPOYG--  
 BGBP 221 TINDIEVLSRLRAILOKKKHLIEHTVAFGRHVPVVEREGESLENESEKROIEVNGDY

HDL-BGBP 279 -EKHFQVEMIGSCALPQKAGDIQVEMVPRPAFLNAYVVDRTCARKKEMEVSPROG  
 BGBP 281 VEKEFKVENSSCNLEBCTNANQTMVREOPELTAQILVNRLSPKIERLAVNFAOS

HDL-BGBP 337 NYVDFNDEVIADLESFQHGDTYKTTTPNN--SPVQNLSCGNWVIEDPNDAITPTVYGVVT  
 BGBP 341 VEVDFDTYNTDIRNFTFGEDLRLTTPDRSAAQVHSGSGWVVDIDAABEATNIGDVI

HDL-BGBP 397 YNAKGLTIRESTMILSSTESAEINILOWKTERNGDTRDYFLKLGKRSRYGMILKRTTI  
 BGBP 399 YRANCKLQIRESTMILSADG--NENILOWKTEREGAYDYFLKLGRESRYGMILKRTTI

HDL-BGBP 456 TDIAMVDIEGGFKAGPMMNEELFTSMWGRS-NGVVTGEGINQVGNHGHSHLAKKBERNA  
 BGBP 459 TDIAMVDIEGGFKVGPFOHEEELFTSKMKKEPQGSVTEGGSISYGDHGHSHLRIERTIDA

HDL-BGBP 516 ERKSAETENSAENLPOVNSVSVSGNYDFNHKVVIFVVINADGRESKIDINADENETSQ  
 BGBP 519 AERSAETRWNSENLPPYQVQSVSGNYDVKGRVFNAEIKVNEREPKIDINISNSESQRS

HDL-BGBP 576 RNTAMISDFELGTFKRTTELTVEVDVSHPNRQSTEAVDKFORSESQNAKWNRSQCFDTL  
 BGBP 579 RNTIEWDVPHLG-EEQVQLTESHNEREATSKEINAVAKLGRROAKYKAWNRSQCFDTL

HDL-BGBP 636 EGNIEAKSDFLQDFLIVVEYDVENIADAHAEVDLRTYTDGDKDEFKRWTRKSDTHLE  
 BGBP 638 EGTIEVKSDFLQDINISLRYDVENIADAHAEVYSRKPADQOERYANRWTRKSGAEELLE

HDL-BGBP 696 NEVYFDSNFELESHARAVANADYGGITKLLSGLEWDDKKISLTLVEVRKNKISGILHTPFE  
 BGBP 698 CEVYIDQSDLELESHARVENKADASDITHLRSGLEWDDKVVILLDMGRQOEFSEIRKLETPFE

HDL-BGBP	756	GFETTEITFLQYKLTGKDKSVKATVQRGTRKASFNMSVSTGIGGEGSEKVDLTTNDFVVMN
BGBP	758	NPETRECEITTYSLAGKDRVVTLRVRRGRKRVDMNPSVNRKSKRRGDRSES LTTNDFVVMN
HDL-BGBP	816	PHLDGQYENKVAQNYQRNDQMNENKRNKSSKASDDEEETIPESGQNTPTAAS YDVQD
BGBP	818	VNTRKESYKGGCAQNYQRNDYKYSRECCADVGGKSDDEELRTEGEGSES LRTAAYDVED
HDL-BGBP	876	PHDCTGDEEKELASLSLEPEGNSMDFSDHGTNRNDRRYVMTHGCTSSFAVLYMTHLKLDSG
BGBP	878	PLACGCTEPKLAGLKLLEPEYKRNINVOGRNSERGLTEELDSESSLITDKKTHLGLDSE
HDL-BGBP	936	LNTEARIGGFETTFNDFKFNYSNHFERRANNGYATREKLESTLRETPALVIGGRGGQER
BGBP	938	LSTEARIGGFETTVNDFELKIDNHFERRENGDYATREKLESTLRETPALVFGGRKDEER
HDL-BGBP	996	ITTEGYGEDKREITFSVKGKNNFLGGTSGKVDLPSICMEGVNEDVYVSTPQDNILOIKVET
BGBP	998	IVTEGYGEGQBITFSVKGKNNRNSCFSCSADIEPNYMEGVNEDVYVSGFQGDDELIVKREI
HDL-BGBP	1056	RLNENGQOEVEAHTFLDSEGTICARLISAVLGDHSLRVFRSAPDGHVADAGLDDYNYKLRG
BGBP	1058	RLGEDDOEVEAHTFYNSRQVKARLINSFYTGDSLSLRARRGHASDSSTETELGLDDYNYKLRG
HDL-BGBP	1116	GFKNEDYARGVQLGEGYFGKRFLLIDDLTQSEGRKYSSEGLTIRHPTFGMERKMGGLFTWEN
BGBP	1118	GLMGDCIKRGAMLEGDFRGNKFLIDSLEQSEGOVSRGKLTQTEPTCMERKMGGLFTLSEN
HDL-BGBP	1176	QNKKLMHAHAEHFLPSYTTETITGEISLDDKKGKNGSAWVDEVAGEEPTNRCNLAGSSTSQG
BGBP	1178	VNTNIMAHAEVFLPSCLEKKEITCKFNINNDKLDGAWVDFVAGEEPTNRCVY-----
HDL-BGBP	1236	YTGSLEFYTTIPCCITCCGDR
BGBP		.....

Fig 6. Alineamiento de las proteínas de reconocimiento de beta glucanos del camarón *Penaeus vannamei* (HDL-BGBP) y del langostino de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* (BGBP) (GenBank No. de Acc.X80687). Residuos idénticos se muestran en letra blanca y fondo negro y los residuos conservados se observan en letra blanca y fondo gris.

beta y 31 % de otras (Ryan y cols.,1992), HDLp de *Locusta migratoria*: 30 % de hélices alfa, 60 % de hojas beta (Kashiwazaki e Ikai, 1985) y 10 % de otras y HDL de *Triatoma infestans*, 43 % de hojas beta (Rimoldi y cols., 1999). Estos resultados se esquematizan en la Fig 7, donde se aprecia la estructura probable según la secuencia de aminoácidos, que se realizó tomando en consideración la confianza de probabilidad de la predicción (PSIPRED).

El análisis de los dominios hidrofóbicos (Hydrophobic Cluster Analysis HCA, por sus siglas en inglés) de las estructuras secundarias de HDL-BGBP de *P. vannamei*, así como BGBP de *P. leniusculus*, se aprecian regiones hidrofóbicas muy similares, como se muestra en la Fig 8; encontramos al menos 11 regiones similares entre estas dos proteínas. La región previa al amino terminal y la región carboxi terminal son muy similares en ambas proteínas, así como la región que contiene al tripéptido RGD, en el caso de *P. vannamei* y la región RGE y RGD de *P. leniusculus*, forman lo que se llama una vuelta o giro, se ha reportado mediante estudios cristalográficos y de resonancia magnética nuclear (NMR) para proteínas involucradas en la unión celular, que en las vueltas RGD, los residuos R y D están expuestos hacia fuera y que la rigidez de esta vuelta o de la región cercana a la estructura del tripéptido es esencial para la unión (Papadopoulos y cols, 1998).

Los análisis de HCA han sido una herramienta utilizada para estudios de comparación de proteínas que realizan una función similar pero que a nivel de aminoácidos no mostraron similitud, como la vitelogenina de la lamprea, *Petromyzon marinus*, apolipoproteína de *Locusta migratoria*, apolipoproteína-B de humanos y para la subunidad grande de la proteína transportadora de triglicéridos de mamíferos, en los cuales se encontraron dominios conservados en los alineamientos de estas proteínas, así como la conservación de una región de hélices alfa en particular, de la cual se sugiere adopta una estructura globular de baja afinidad por los lípidos y que incluye a esta región anfipática de hélices alfa (Babin y cols., 1999).


También se analizaron los perfiles hidropáticos de HDL-BGBP y BGBP de *P. vannamei* y *P. leniusculus* respectivamente y resultaron muy similares (Fig 9) a pesar de


tener 50 % de identidad entre ellas. La similaridad aumenta a más del 70 % cuando se consideran los residuos conservados por lo que le permite tener un comportamiento hidropático muy similar, ya que los aminoácidos que son reemplazados por otros con las mismas características. Cuando la HDL-BGBP del camarón se comparó con la apolipoproteína de *M. sexta* (U57651, Sundermeyer y cols., 1996) no se observaron regiones similares en el perfil hidropático, por lo que se asume que esta similitud solamente se mantiene entre lipoproteínas de crustáceos.




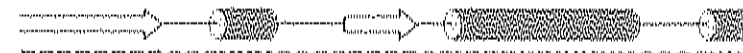






Conf: }  
 Pred:   
 Pred: CCEEEEECCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCEEEEE  
 AA: ESKIDINIADINPTSSRNTAMISIPLLGPTFKRTELTVSH  
 570 580 590 600


Conf: }  
 Pred:   
 Pred: CCCCCCHHHHHHHHHCCCCCEEECCCCCCCCCEEEEE  
 AA: DFSPNKRKISAVAKFGRSESFINAKWNRSDGFDTLIGNI  
 610 620 630 640

Conf: }  
 Pred:   
 Pred: EEEEEEEEEEEEEEEECCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCE  
 AA: EAKSRFLGDFLINVRYDMSNIADAHAEVDYLRTTTDGDKK  
 650 660 670 680

Conf: }  
 Pred:   
 Pred: EEEEEEECCCHHHCCCCCEEEECCHHHHHHHHHHHCCCCCHH  
 AA: EFKLNWTRKSTDDHLENEMVFDNSNFETLSHARAYANADYG  
 690 700 710 720

Conf: }  
 Pred:   
 Pred: HHHHHHHCCCCCCEEEEEECCEEEEEEEECCEEEEEECCE  
 AA: GIFKLLSGLDWDKIKISLTLVVRKKNKISGILTPFEGFET  
 730 740 750 760

Conf: }  
 Pred:   
 Pred: EEEEEEECCCEEEEEEEECCEEEEEEEECCEEEEEECCE  
 AA: LEIDLQYKLTGKDKSVKATYQGRKASFNMEMSTKGGKRG  
 770 780 790 800

Conf: }  
 Pred:   
 Pred: CCEEEEECCCHHHHHHHCCCCCCEECCEEEEEEEEEEEEEEE  
 AA: GSFKVDLTPPFVVKNIJHIDGQYENKVAQINYQRNDIQMN  
 810 820 830 840



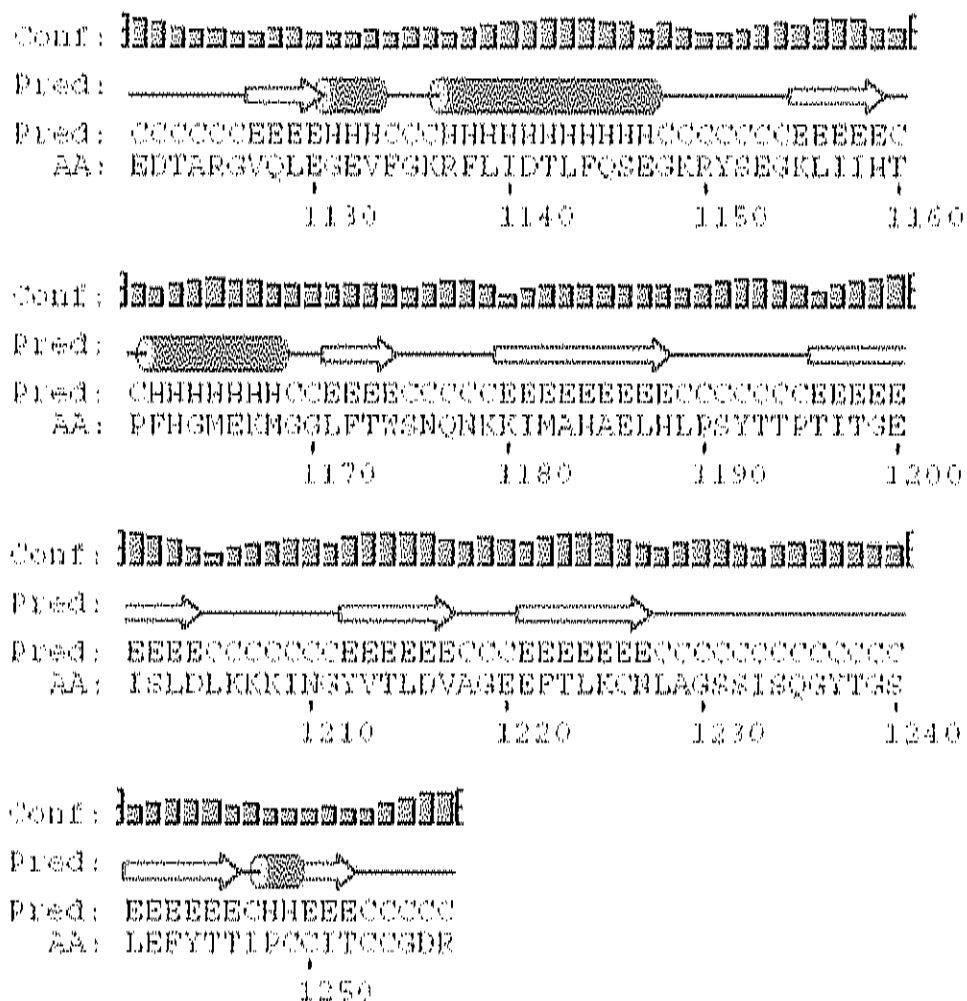


Fig 7. Predicción de la estructura secundaria de la proteína madura HDL-BGBP de *P. vannamei*. H: Hélices alfa, E: Hojas Beta, C: Giros, Conf.: Confianza de la predicción, Pred.: Predicción de la estructura secundaria, AA: Secuencia de aminoácidos.



*P. leinusculus*

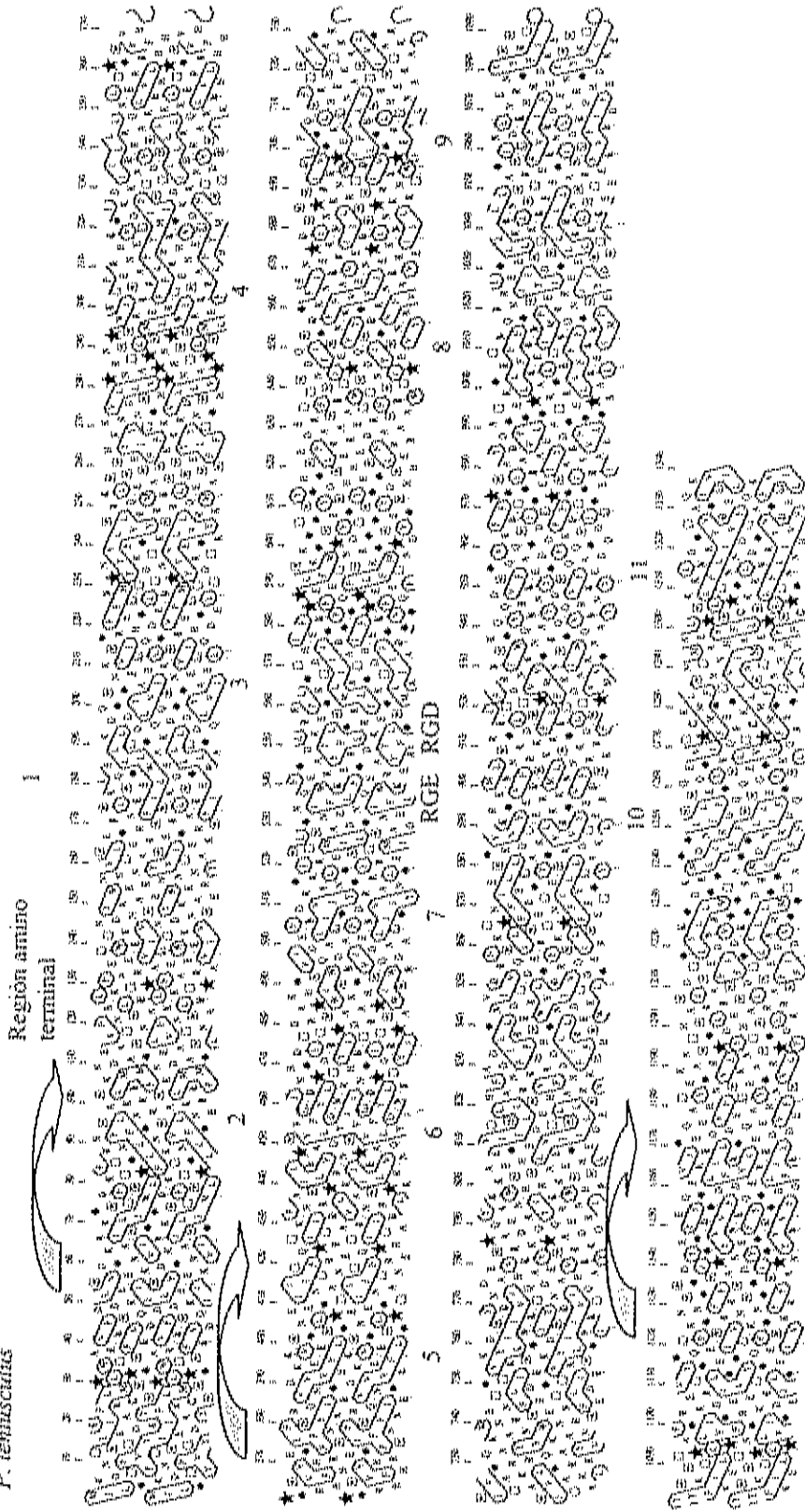



Fig 8. Comparación de las regiones hidrofóbicas de HDL-BGBP de *P. vannamei* y BGBP de *Pac. leiusculus* realizados según el método de HCA. Los aminoácidos están representados por el código de una letra, excepto los aminoácidos que están representados por símbolos: ♦ Diamante: Glicina, ⊞ Cuadrado con un punto: Serina, □ Cuadrado: Treonina y ★ Estrella: Prolina.

 Regiones hidrofóbicas.

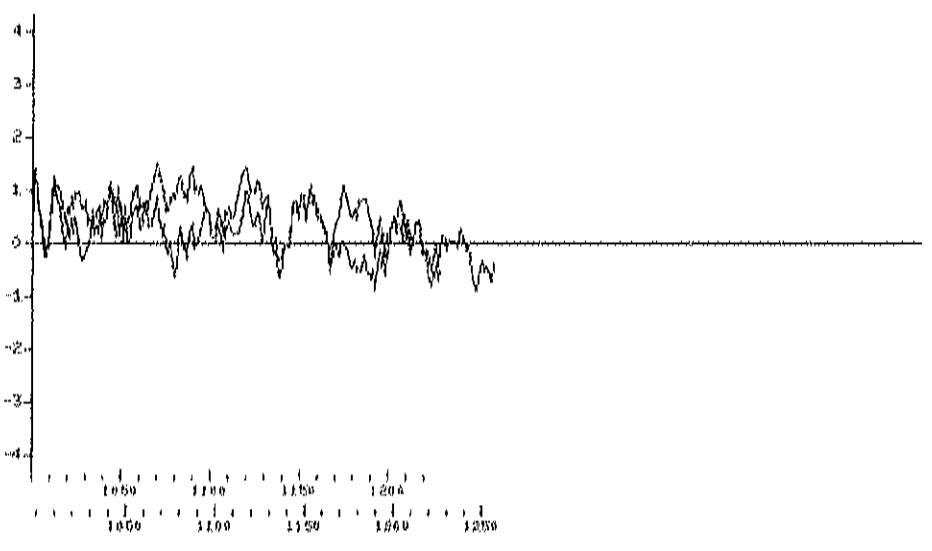
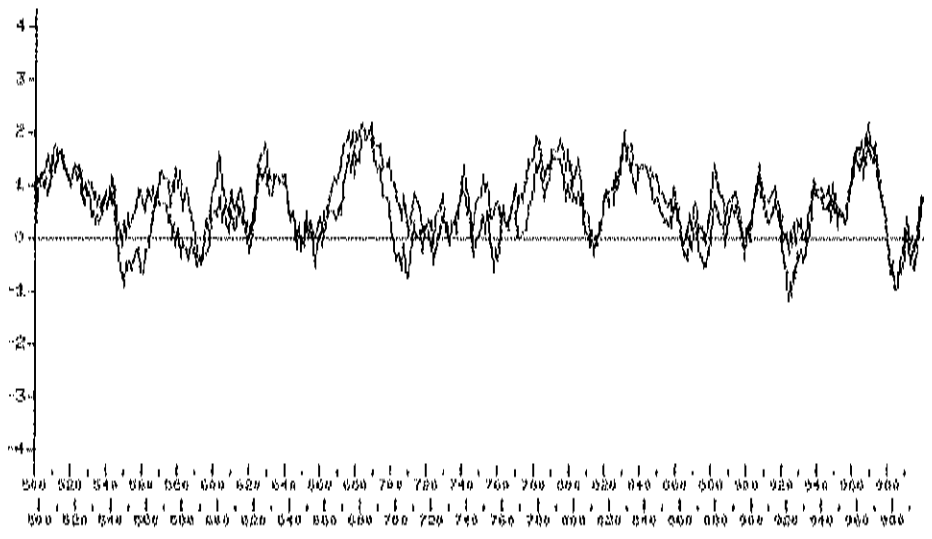
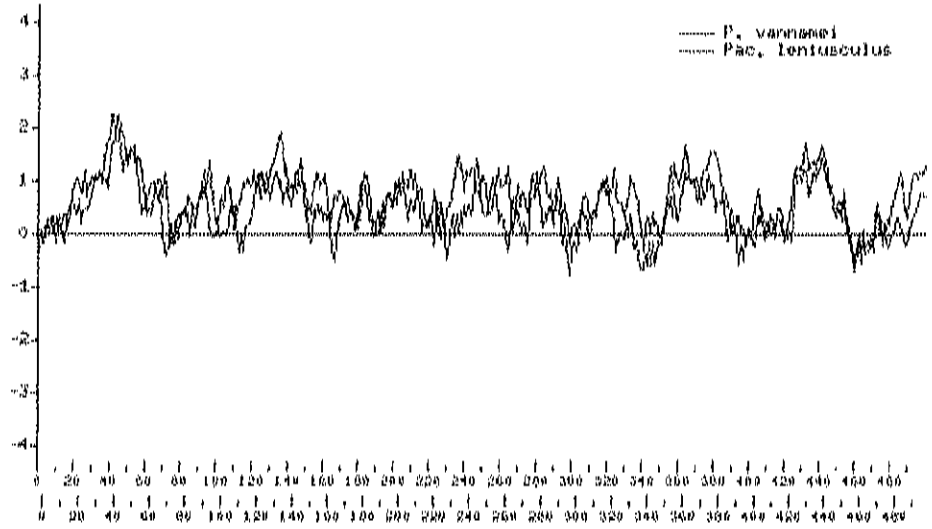




Fig 9. Comparación de los perfiles hidropáticos de HDL-BGBP de *P. vannamei* y BGBP de *Pac. lenisculius* según el método de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (1982). Aminoácidos hidrofóbicos están representados por índices hidropáticos positivos y los aminoácidos hidrofílicos están representados por valores negativos.

### Tamaño y Expresión del Mensaje de HDL-BGBP

#### **Northern blot**

La determinación del tamaño del mRNA que codifica para la HDL-BGBP del camarón blanco se efectuó en RNA total extraído del hepatopáncreas. Este se efectuó utilizando dos sondas marcadas radioactivamente (como se describió anteriormente) para HDL<sub>1</sub> y la sonda HDL<sub>2</sub> comprende casi todo el cDNA. El tamaño esperado para HDL-BGBP es de 6.3 Kb como mínimo, según los datos obtenidos de la secuencia del cDNA, al utilizar la sonda HDL<sub>1</sub> que corresponde a la región 5' del cDNA se de HDL<sub>1</sub>En la, se observaron dos bandas con un barrido de fondo desde 2.37 Kb hasta los 7.40 Kb (Fig 10, panel A) mientras que utilizando la sonda HDL<sub>2</sub>, se observó una banda de alto peso molecular (Fig 10, panel B)

Este resultado fue consistente en todos los ensayos que se realizaron para estimar el tamaño del mRNA y puede deberse a una fuerte estructura secundaria del mRNA de HDL-BGBP para evitar la desestabilización y la degradación, lo que lleva a una migración anómala en el gel. En los resultados obtenidos de los autoradiogramas, se observaron dos bandas (mayor a 2.37 Kb y 4.40 Kb), este efecto no se presentó en la determinación del tamaño de mensaje para la BGBP de *P. leniusculus*, en el cual se observa una banda de alto peso molecular (mayor a 4.9 Kb) (Cerenius y cols., 1994).

#### **Extensión del Primer de la Región 5'**

Con el fin de estimar con mayor precisión el tamaño del mRNA de la HDL-BGBP de camarón, se utilizó la técnica de la extensión del primer de la región 5'. Como se describió en materiales y métodos se utilizaron tres primers antisentido específicos para HDL-BGBP y se utilizaron dos tipos de templado: mRNA y RNA total de hepatopáncreas, el cual es el órgano experimentalmente determinado como sitio de síntesis de la HDL-BGBP (Yepiz-Plascencia y cols., 2000a).

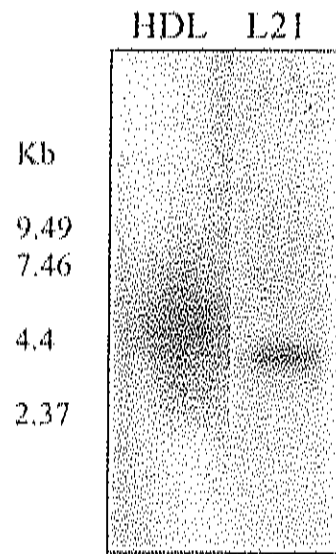


Fig. 10. Autoradiografía de un Northern blot para estimar el tamaño del mRNA de HDL (HDL-BGBP) y el mRNA de L21 (control constitutivo) en *P. vannamei* utilizando un fragmento interno de HDL (generado con HDL1Plus-HDL4Aminus) y para L21 (generado con L21 Fw y L21Rv) marcados radioactivamente.

Para la reacción mRNA de hepatopáncreas y el primer HDLRv-0 se obtuvieron 3 bandas de aproximadamente 20, 40 y 100 pb, en cuanto a la posición del primer en el cDNA y el tamaño esperado para el codón que codifica a la  $M_a$  son 83 pb, las bandas obtenidas de extensión están en el rango como se observa en la Fig 11, Carril 1.

Para la reacción mRNA de hepatopáncreas primer HDLRv-1 (Carril 2), se obtuvo un barrido muy ligero, no se pudieron estimar bandas y para la reacción mRNA de hepatopáncreas y el primer HDLRv-2 (Carril 3), se obtuvo claramente una banda de aproximadamente 40 pb, este último resultado es consistente con la reacción en la cual se utilizó como templado RNA total de hepatopáncreas y el primer HDLRv-2 (Carril 4). Además se observó una banda de aproximadamente 200 pb; la posición del primer HDLRv-2 al codón que codifica para la  $M_b$  potencial son 49 pb lo cual es similar a la banda obtenida para el mRNA y el RNA total. Estas bandas confirman los sitios potenciales de inicio de la proteína y sin embargo la banda mas abundante es la que corresponde a la  $M_b$ , lo cual coincide con lo establecido por Cerenius y cols., (1994) para la BGBP de *P. leniusculus*.

### **Expresión del mRNA de la HDL-BGBP**

RNA blot. Para investigar la presencia del mensaje de la HDL-BGBP en diferentes tejidos, se utilizó RNA total de hepatopáncreas, hemocitos, músculo, pleópodos y branquias de camarón blanco. Una vez obtenido el RNA total, se determinó la concentración de las preparaciones mediante la  $A_{260}$  y el grado de pureza se estimó utilizando la relación de la lectura  $A_{260/280}$ . Los valores obtenidos así como el rendimiento de RNA total aislado por gramo de tejido utilizado se muestran en la Tabla 4. La integridad y calidad de las preparaciones de RNA de los diferentes tejidos se analizó electroforéticamente en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído, en los cuales se aplicaron 5  $\mu$ g de RNA total de hepatopáncreas (Carril 1), hemocitos (Carril 2), músculo (Carril 3), pleópodos (Carril 4) y branquias (Carril 5).

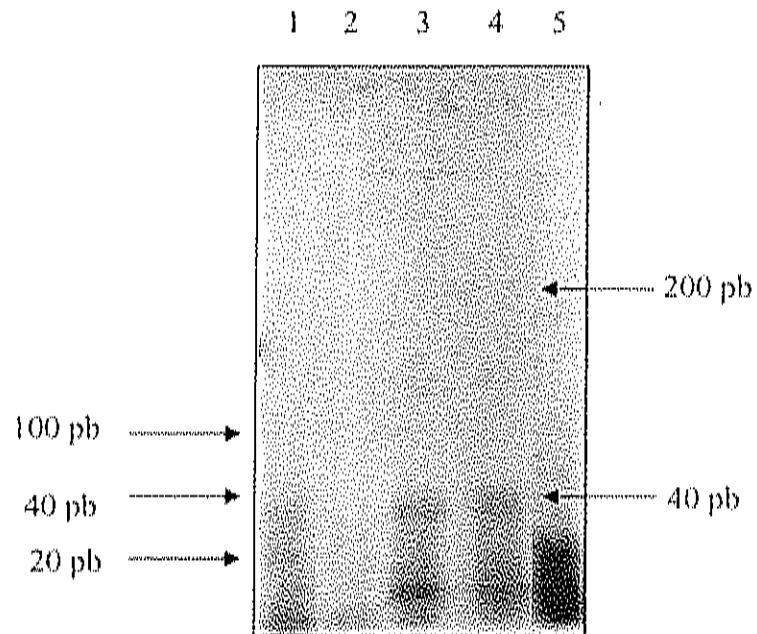


Fig 11. Autoradiografía de los productos de la extensión del primer en la región 5'. Carril 1, mRNA de Hep extendido con el primer HDLRv-0, Carril 2, mRNA de Hep extendido con el primer HDLRv-1, Carril 3, mRNA de Hep extendido con el primer HDLRv-2; Carril 4, RNA total de Hep extendido con el primer HDLRv-2; Carril 5, RNA total de Hep extendido con el primer L21Rv.

En la Fig 12, se observa el patrón del RNA con la banda predominante correspondiente al RNA ribosomal de aproximadamente 2 Kb y su presencia indica que no hay degradación del material total.

**Tabla 4.** Calidad, concentración y rendimiento del RNA total de diferentes tejidos del camarón blanco

Tejido	A <sub>260/280</sub>	Concentración µg/µl	RNA total extraído (µg)	Rendimiento mg RNA/g tejido
Hepatopáncreas*	1.75	2.68	4824	4.269
Hemocitos	1.52	1.16	232	3.012
Músculo	2.21	0.68	272	0.236
Pleópodos	1.94	1.4	560	0.727
Branquias	1.85	1.12	448	1.866

Se procedió a realizar un RNA blot, en el cual se aplicaron 4 µg de RNA de hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias. Para este experimento se utilizó una sonda marcada radioactivamente que corresponde a un fragmento interno del cDNA de la HDL-BGBP (producido por los primers HDL1Plus y HDL2Minus, 1270-1995 nt, generando un fragmento de aproximadamente 700 pb) y se procedió a analizar por autoradiografía el RNA blot.

La intensidad del mensaje de HDL-BGBP está en relación a la cantidad de mRNA por lo que se interpretó de la siguiente manera: de mayor a menor expresión en hepatopáncreas, músculo, branquias y pleópodos. Estos resultados fueron la primera evidencia de la existencia del mRNA para HDL-BGBP en otros tejidos diferentes a hepatopáncreas (Fig 13, panel A). Para confirmar los resultados obtenidos en el RNA blot, se decidió utilizar la técnica de RT-PCR para realizar la identificación y semicuantificación del mensaje de HDL-BGBP.

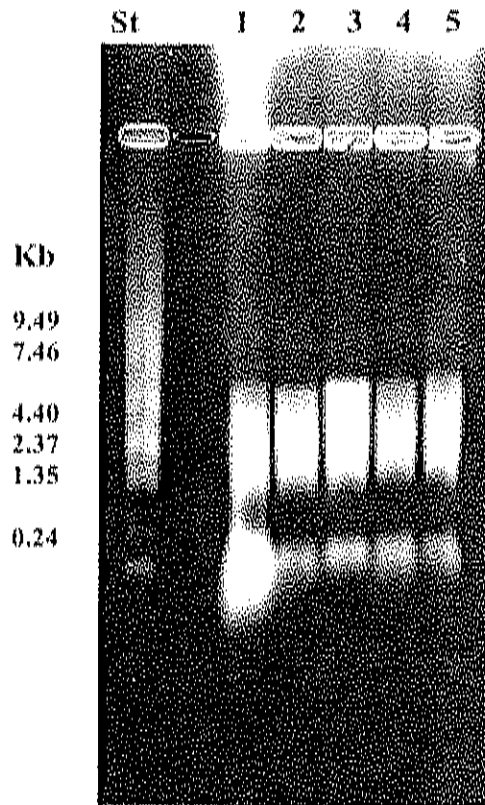


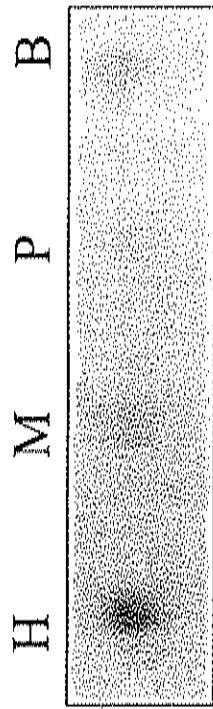
Fig 12. Calidad del RNA total aislado de diferentes tejidos del camarón blanco. Carril St RNA ladder; Carril 1, RNA total de hepatopáncreas; Carril 2, hemocitos; Carril 3, músculo; Carril 4, pleópodos y Carril 5, branquias. En todos los carriles hay 5  $\mu$ g de RNA total.

RT-PCR. Con el fin de identificar la presencia del mRNA de HDL-BGBP en otros tejidos y realizar una semicuantificación del mismo, se utilizó la técnica de RT-PCR (como se describió anteriormente). Esta técnica permite realizar un experimento mas controlado y sobre todo con pequeñas cantidades de RNA total, en esta ocasión se utilizaron los tejidos hepatopáncreas, hemocitos, músculo, pleópodos y branquias, con primers específico para HDL-BGBP (HDL6Plus-HDL13Minus, los cuales generan un fragmento de 730 pb) correspondientes a las posiciones 3006-3773 del cDNA (incluyendo la región de los primers) y también se utilizaron primers específicos para la  $\beta$ -actina, los cuales se utilizaron como control de gen constitutivo (ACT-S y ACT-AS, los cuales generan un fragmento de 450 pb). Los productos de amplificación fueron resultado de utilizar cantidades iguales de cDNA (se utilizaron 1.2  $\mu$ g de RNA total, es decir, 60 ng equivalentes de Poli A<sup>+</sup> fueron convertidos a cDNA/  $\mu$ L en una reacción total de PCR de 50  $\mu$ L) y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con una solución de bromuro de etidio de 1  $\mu$ g/mL y sometido a análisis densitométrico utilizando el sistema EDAS (KODAK).

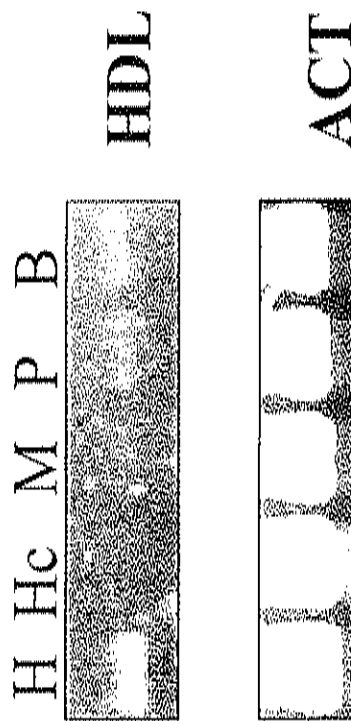
Como se observa en la Fig 13, panel B, existe una correspondencia de los resultados para HDL-BGBP del RT-PCR con los resultados del RNA blot y en hemocitos no se encontró la banda correspondiente a HDL-BGBP. Por otro lado se obtuvieron los valores de intensidad de las bandas (expresadas como pixeles) y a continuación se muestran en la Tabla 5, en donde se comparan los niveles de expresión de HDL-BGBP con respecto a Actina. En la Fig 13, panel C, se observa un análisis en geles de agarosa de las muestras de RNA que fueron utilizadas para el RT-PCR. Aquí se utilizaron RNA (-RT) y cDNA (+RT) y se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los primers específicos para Actina, utilizando las condiciones descritas para el RT-PCR. Los resultados demostraron que en las muestras de RNA no presentaban DNA, a partir del cual se pudieran generar resultados falsos.



**A**



**B**



**C**

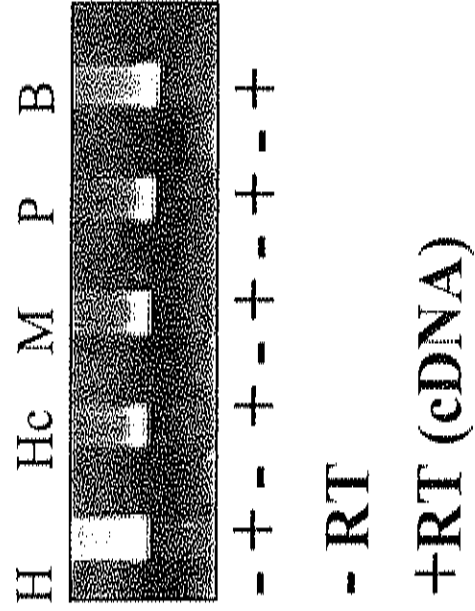


Fig 13. Expresión del mRNA de HDL-BGBP de *P. vannamei*. **Panel A**, RNA blot, 4 µg de RNA total de H (Hepatopáncreas), M (Músculo), P (Pleópodos) y B (Branquias) utilizando como sonda radioactiva un fragmento interno de HDL-BGBP (HDL1Plus-HDL2Minus, 700 pb). **Panel B**, RT-PCR de diferentes tejidos H (Hepatopáncreas), Hc (Hemocitos), M (Músculo), P (Pleópodos) y B (Branquias), bandas amplificadas a partir de 1.2 µg de RNA total (60 ng equivalentes de Poli A<sup>+</sup>) sintetizados a cDNA en una reacción de 50 µL, para el ensayo de HDL se utilizaron los primers específicos HDL6Plus-HDL13Minus y para el ensayo de Actina se utilizaron los primers ACT-S y ACT-AS. **Panel C**, RT-PCR de actina utilizando RNA total sometido a RT (RT+, cDNA) y RNA control (RT-), no se observa contaminación con DNA.

**Tabla 5.** Densitometría expresada como intensidad neta (pxl)

<b>Tejido</b>	<b>Int. Neta (Pxl's)HDL-BGBP</b>	<b>Int. Neta (Pxl's) Actina</b>	<b>Act vs HDL-BGBP</b>
<b>Hepatopáncreas</b>	14,363.93	69,329.45	4.8 X
<b>Hemocitos</b>	0.00	75,563.06	0
<b>Músculo</b>	492.02	70,176.42	142.6 X
<b>Pleópodos</b>	7,347.29	47,604.28	6.47 X
<b>Branquias</b>	3,369.33	57,125.52	16.9 X

Como puede apreciarse en la Tabla 5, los resultados de RT-PCR confirman los resultados obtenidos con el RNA blot y se muestra al hepatopáncreas como el tejido mas activo en la expresión del mRNA de HDL-BGBP, además de que se observa el comportamiento del mRNA de actina, utilizado como un control constitutivo comparativo en cada tejido. Esto es completamente opuesto a los resultados obtenidos por Cerenius y cols (1994) para la expresión del mRNA de BGBP de *P. leniusculus*, ya que únicamente reportan la expresión hepatopáncreas.

#### Estructura del Gene de HDL-BGBP

La presencia de intrones se investigó por PCR comparando el cDNA de la HDL-BGBP (Fig 14) con DNA genómico total usando diferentes combinaciones de primers específicos y estimando los tamaños para cada combinación. Inicialmente se probaron las amplificaciones utilizando como templado de DNA: 1) genoteca de cDNA de hepatopáncreas, 2) plásmido pPvHDL3 (aislado del banco de genes de cDNA de hepatopáncreas) y 3) DNA genómico de músculo de camarón blanco. Estas reacciones se llevaron a cabo según la reacción base de PCR (descrita anteriormente) utilizando solo 2  $\mu$ L de genoteca, 60 ng del plásmido y 100 ng de DNA genómico. Las combinaciones de los primers se presentan en la Tabla 2 y en la Fig 14 se muestra un esquema de la localización y fragmento producido con las diferentes combinaciones

cDNA de la HDL-BGBP de *P. vannamei*

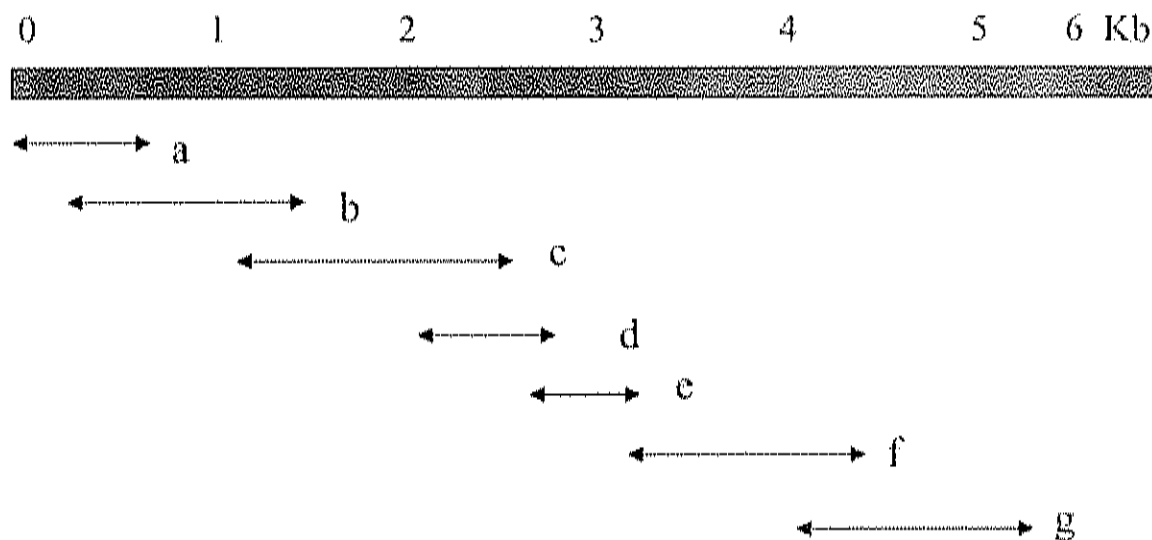


Fig 14. Esquema del cDNA de la HDL-BGBP de camarón blanco representando diferentes combinaciones de primers. a) HDL5UTRa-HDL5Minus, b) HDL5UTRb-HDL10Minus, c) HDL1Plus-HDL17Minus, d) HDL3Plus-HDL12Minus, e) HDL6Plus-HDL13Minus, f) HDL8Plus-HDL7Aminus y g) HDL14Plus-HDL4Aminus. Estos fragmentos fueron amplificados utilizando cDNA (banco de genes de hepatopáncreas y pPvHDL3) y DNA genómico de camarón.

teniendo como base el cDNA de la HDL-BGBP de camarón. En la Fig 15, se muestran los fragmentos obtenidos de las diferentes reacciones utilizando cDNA y de DNA genómico, los cuales se analizaron en un gel de agarosa al 1.2%, donde no se observan diferencias entre las bandas provenientes de cDNA y genómico, por lo que se infiere que no hay intrones en el gen de la HDL-BGBP.

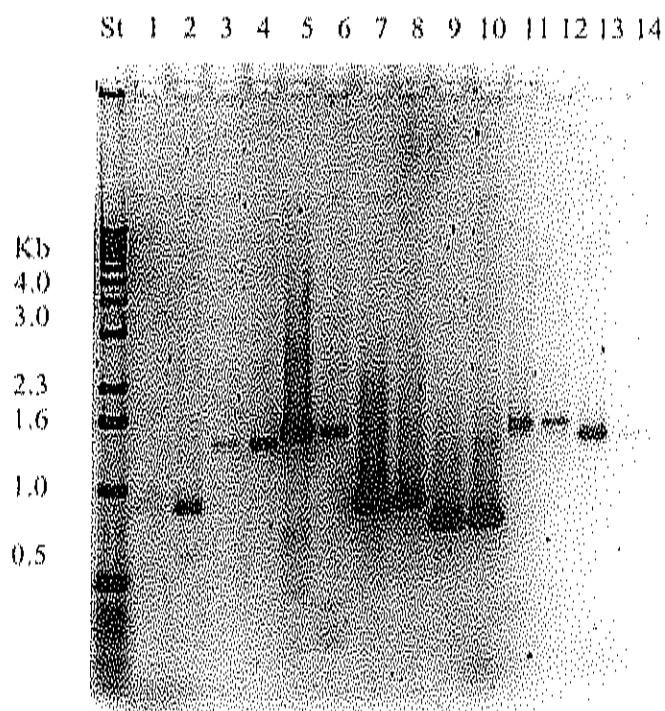


Fig 15. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1.2% de los productos amplificados con los diferentes combinaciones de primers. St Estándar 1 Kb DNA ladder, Carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 cDNA de hepatopáncreas (a partir del banco de genes y del pVHDL3), Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 DNA genómico de músculo de camarón. Carriles 1 y 2 HDL5UTRa-HDL5Minus, 3 y 4 HDL5UTRb-HDL5Minus, 5 y 6 HDL1Plus-HDL17Minus, 7 y 8 HDL3Plus-HDL12Minus, 9 y 10 HDL6Plus-HDL13Minus, 11 y 12 HDL8Plus-HDL7Aminus y 13 y 14 HDL14Plus-HDL4AMinus.

## CONCLUSIONES

La secuencia completa del cDNA de la HDL-BGBP del camarón blanco *Penaeus vannamei*, se obtuvo secuenciando clones aislados del banco de genes de hepatopáncreas de camarón blanco utilizando cribado del banco de genes así como amplificaciones por PCR. Esta secuencia tiene un tamaño de 6.3 Kb, de los cuales 3.7 Kb corresponden al marco de lectura que codifica para la proteína madura y también posee una larga extensión en el extremo 3'UTR de 1.9 Kb en donde se aprecia la señal de poliadenilación así como la cola de Poli A+.

La secuencia deducida de aminoácidos del precursor, obtenida a partir del cDNA es de 1438 aminoácidos y 1257 aminoácidos corresponden a la proteína madura. En la secuencia deducida se localizaron los péptidos obtenidos por digestión con Lys-C de la proteína purificada, así como sitios potenciales de glicosilación, fosforilación y la región RGD (integrinas). La secuencia mostró un 50% de identidad con la secuencia deducida del cDNA de la BGBP del langostino de agua dulce *P. leniusculus* y una similitud del 70% si se consideran los reemplazos conservados, Además se obtuvieron predicciones estructurales con las secuencias deducidas y las regiones hidrofóbicas y perfiles hidropáticos de ambas, son similares.

El mRNA que codifica para la HDL-BGBP presentó un tamaño heterogéneo entre 4.4 y 7.4 Kb; utilizando la técnica RNA blot se detectó la presencia del mRNA en: hepatopáncreas, músculo, pleópodos y branquias; en hepatopáncreas se detectó la mayor cantidad de mRNA y estos resultados fueron confirmados y semi-cuantificados por RT-PCR y comparados con el mRNA de Actina como control constitutivo.

## BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S. F., Gish, G., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol; **215**: 403-410.
- Babin, P. J., Bogered, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. A. y Van der Horst, D. J. (1999). "Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor." J Mol Evol **49**: 150-160.
- Bagshaw, J. C. y Buckholt M. A. (1997). "A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*." Gene **184**: 211-214.
- Benson, G. (1999). "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences." Nucleic Acid Res **27**(2): 573-580.
- Bernard, L., Laroux, C., Hayes, H., Gautier, M., Chilliard, Y. y Martin P. (2001). "Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon." Gene **281**: 53-61.
- Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P. y Timmermans, M. (1998). "Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade". J Biol Chem. **273**(38): 24948-54.
- Bimboim, H. C. and Dolly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-152.
- Bimboim, H. C. (1983). A rapid alkaline method for the isolation of plasmid DNA. Method Enzymol. **100**: 243-255.
- Bogerd, J., Babin, P.J., Kooiman, F. P., André, M., Ballagny, Ch., Van Marrewijk, W. y Van Der Horst, D. J. (2000). "Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*". J Comp Neur. **427**:546-558.



- Cerenius, L., Liang Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Tapio-Palva, E., Iwanaga, S. y Söderhäll, K. (1994). "Structure and biological activity of a 1,3- $\beta$ -D-glucan-binding protein in crustacean blood." J Biol Chem **269**(47): 29462-29467.
- Chen, H. Y. (1993). "Requirements of marine shrimp, *Penaeus monodon*, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol". Aquaculture, **109**: 165-176.
- Chen, Y.-N., Tseng, D.-Y., Ping-Yueh, H., y Ching-Ming, K. (1999). "Site of vitellogenin synthesis determined from cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*." Mol Rep Develop **54**: 215-222.
- Chirwing, J. M., Przybyla, A. E., Mc Donald, R. J. y Rutter, W. J. (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." Biochem, **18**: 5294-5299.
- Chomczynsky, P. y Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**: 152-159.
- Cole, K. D., Fernando-Warbajykasyriya, G. J. P., Boguski, M. S., Freeman, M., Gordon, J. J., Clark, W. A., Law, J. H. y Wells, M. A. (1987). "Primary structure and comparative sequence analysis of an insect apolipoprotein. Apolipoprotein-III from *Manduca sexta*." J Biol Chem, **262** (24):11794-11800.
- Dall, S., Hill, B. J., Rothlisberg, P.C. y Staples, D. J. (1990). The Biology of the Penaeidae. Adv Marine Biol, J. H. S. a. S. Blaxter, A. J. London, Academic Press. **27**: 489.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C. y Weisner, A. (2001). "Lipoprotein of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*." Cell Tissue Res **306**: 449-458.
- Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day III, R. S. y Paterson, M. C. (1988). "Northern blotting: efficient RNA staining and transfer." Focus **10**: 5-7.

- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hall, M., Van Heusden, M. C., y Söderhäll, K. (1995). "Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting." Biochem Biophys Res Commun **216**(3): 939-946.
- Higgins, D. G., Bleasby, A. J. y R., F. (1992). "CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment." Comput. Appl. Biosci. **8**: 189-191.
- Hirai, M., Watanabe, D., Kiyota, A. y Chinzei, Y. (1998). "Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary." Insect Biochem Molec Biol **28**: 537-547.
- Hoeflich, A., Reisinger, R., Vargas, G. A., Elmlinger, M. W., Schuett, B., Jehle, P. M., Kenner-Muller, I., Lahm, H., Russo, V. C. y Wolf, E. (2002). "Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 *in vivo*." FEBS Letters **523**: 63-67.
- Kanost, M. R., Kawoya, J. L., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M.C. y Ziegler, R. (1990). "Insect Haemolymph Proteins." Adv. Insect Physiol. **22**: 236-299.
- Kashiwazaki, Y. e Ikai, A. (1985). "Structure of apoproteins in insect lipophorin". Arch Biochem Biophys. **237**: 160-169.
- Komatsu, M. y Ando, S. (1998). A very-high density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. Bioscience Biotechnology & Biochemistry. **62**: 459-463.
- Lee, R. F. (1991). Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. Advances in Comparative Environmental Physiology. R. Gilles. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **7**: 187-207.
- Lee, S. Y., Wang, R. y Söderhäll, K. (2000). "A lipopolysaccharide- and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning." J Biol Chem **275**(2): 1337-1343.

- Ma, C. y Kanost, M. R. (2000). "A  $\beta$ 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade." J Biol Chem **275**(11): 7505–7514.
- Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I. y Vargas-Albores, F. (1999). "Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*)." Comp Biochem Physiol **122B**: 381-387.
- Niere, M., Meißlitzer, C., Dettloff, M., Weise, C., Ziegler, M. y Weisner, A. (1999). "Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III". Biochem Biophys Acta **1433**: 16-26.
- Papadopoulos, G. K., Ouzounis, C. y Eliopoulos, E. (1998). "RGD sequences in several receptor proteins: novel cell adhesion function of receptors". Int J Biol Macromol **22**:51-57.
- Ochiai, M. y Ashida, M. (2000). "A pattern-recognition protein for  $\beta$ -1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*." J Biol Chem **275**(7): 4995–5002.
- Ouaissi, M. A. (1988). "Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells." Parasitology Today **4**: 169-173.
- Rimoldi, O. J., Soulages, J. L., Finarelli, G. S. y Brenner, R. R. (1999). "Purification and properties of a small lipid-binding protein from the hemolymph of *Tritoma infestans*". Comp Biochem Physiol **122B**: 97-104.
- Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R. y Dhar, A. K. (2002). "The lipopolysaccharide and B-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*)." J. Virol **76**(14): 7140-7149.
- Ruiz-Verdugo, L. M., García-Bañuelos, M., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. y Yepiz-Plascencia, G. (1997). "Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone." Comp. Biochem. Physiol. **118B**: 91-96.

- Ryan, R. O., Kay, C. M., Oikawa, K., Liu, H., Bradley, R. y Scraba, D. G. (1992). "Effect of particle lipid content on the structure of insect lipophorins". J Lipid Res. **33**: 55-63.
- SAGARPA. 2002. Anuario Estadístico de Pesca 2001. México, D. F.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sritunyaluksana, K., Lee, S. Y. y Soderhall, K. (2002). "A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*". Dev Comp Immunol **26**(3): 237-45.
- Stratakis, E., G. Fragkiadakis y CarPELLI-Moustaizi, E. (1992). "Characterization of a non sex-specific lipoprotein from hemolymph of fresh water crab, *Potamon potamins*." Biol. Chem. **373**: 665-674.
- Sundermeyer, K., Hendricks, J. K., Sarvamangala, V. P. y Wells, M. A. (1996). "The precursor protein of the structural apolipoproteins of lipophorin: cDNA and deduced amino acid sequence". Insect Biochem Molec Biol. **26** (8-9):735-738.
- Teshima, S. y Kanazawa, A. (1979). "Lipid transport mechanism in the prawn." Bull Japanese Society of Scientific Fisheries **45**(10): 1341-1346.
- Tom, M., Shenker, O. y Ovadia, M. (1993). "Hemolymph Proteins of *Penaeus semisulcatus* De Haan (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)." Comp. Biochem. Physiol. **104B**: 811-816.
- Tufail, M., Lee, J. M., Hatakeyama, M., Oishi, K. y Takeda, M. (2000). "Cloning of vitellogenin cDNA of the american cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses." Arch Insect Biochem Physiol **45**: 37-46.
- Tufail, M., Hatakeyama, M. y Takeda, M. (2001). "Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the american cockroach *Periplaneta americana*." Arch Insect Biochem Physiol **48**: 72-80.

- Van Heusden, M. C., Thompson, F. y Dennis J. (1998). "Biosynthesis of *Aedes aegypti* lipophorin and gene expression of its apolipoproteins". Biochem Mol Biol **10**: 733-738.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A. y Ochoa, J. L. (1993). "An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*).". Comp Biochem Physiol- A: **106**(2): 299-303.
- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2000). "Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response." Aquaculture **191**(1-3): 13-21.
- Vargas-Requena, C. L., Hernández-Santoyo, A., Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciajara, I., Rodríguez-Romero, A., Soulages, J. L. y Sotelo-Mundo R, R. (2002). "Biophysical evidence of lipid and carbohydrate binding activities of shrimp high density lipoprotein/B glucan binding protein." Protein and Peptide Letters **9**(4): 337-344.
- Weisner, A., Losen, S., Kopáček, P., Weise, C. y Götz, P. (1997). "Isolated Apolipophorin III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of this insect". J Insect Physiol. **43**(4) 383-391.
- Xu, X. L., Ji, W. J., Castel, J. D., O'Dor, R. K. (1994). "Essential fatty acids requirements of the chinese prawn, *Penaeus chinensis*. Aquaculture. **127**: 29-40.
- Yamauchi, Y., Hoeffler, C., Yamamoto, A., Takeda, H., Ishihara, R., Mackawa, H., Sato, R., Su-H, S., Sumida, M., Wells, M. A., y Tsuchida, K. (2000). Arch Insect Biochem Physiol. **43** (1): 16-21.
- Yano, K., Sakurai, M. T., Watabe, S., Izumi, S., Tomino, S., Watabe, S., Izumi, S. y Tomino, S. (1994). "Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*." Biochem Biophys Acta **1218**: 1-10.
- Yeh, M. S., Huang, C. J., Leu, J. H., Lee, Y. C. y Tsai, I. H. (1999). "Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*)". Eur J Biochem **266**: 624-633.

- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. e Higuera-Ciapara, I. (1995). "A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization." Comp Biochem Physiol - B; **111**(2): 181-187.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, Lydia M. y Romo-Figueroa, G. (1998). "Shrimp plasma HDL and  $\beta$ -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics." Comp Biochem Physiol - B; **121**: 309-314.
- Yepiz-Plascencia, G. (2000). Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Hermosillo, Sonora, México.
- Yepiz-Plascencia, G., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F. y García-Bañuelos, M. (2000a). "Synthesis of Hemolymph High-Density Lipoprotein  $\beta$ -Glucan Binding Protein by *Penaeus vannamei* Shrimp Hepatopancreas." Marine Biotechnology **2**: 485-492.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F. e Higuera-Ciapara, I. (2000b). "Penacid shrimp hemolymph lipoproteins." Aquaculture **191**(1-3): 177-189.
- Yepiz-Plascencia, G., Jiménez-Vega, F., Romo-Figueroa, M. G., Sotelo-Mundo, Rogerio R. y Vargas-Albores, Francisco (2002). "Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*." Comp. Biochem. Physiol. **132**(B): 585-592.
- Zhang, L., Ge, L., Parimoo, S., Stenn, K. y Prouty, S. M. (1999). "Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites." Biochem J **349**: 255-2645.