

(TITULO) (AUTOR) (INSTITUCION) (FECHA)

"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL cDNA DE CATALASA DE CAMARÓN BLANCO *Penaeus vannamei*"

Por

OLGA LIDIA TAVARES SÁNCHEZ

Trabajo de Investigación por la

DIRECCION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de

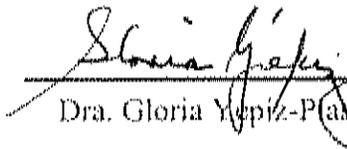
MAESTRO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Diciembre del 2001

APROBACIÓN

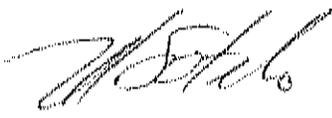
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la IB Olga Lidia Tavares Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría de la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen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



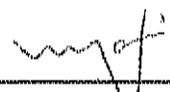
Dra. Gloria Yepiz-Palencia
Directora de Tesis



Dr. Francisco Vargas-Albores



Dr. Rogerio Sotelo-Mundo



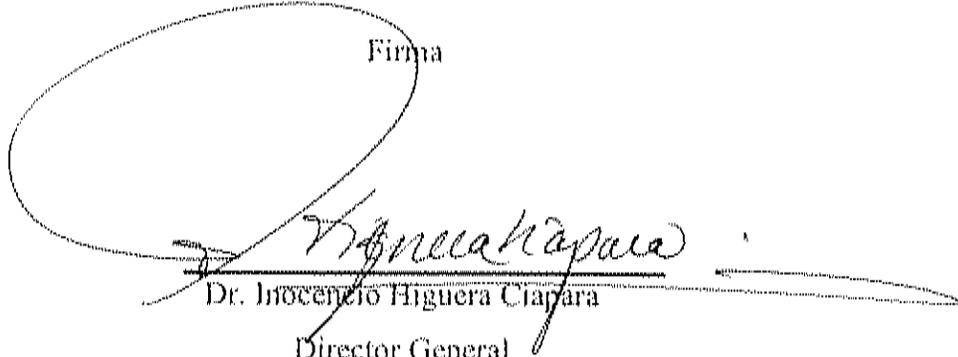
Dra. Maria Islas-Osuna

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), Apto. Postal 1735, Hermosillo, Sonora.

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

Firma



Dr. Inocencio Higuera Chapara
Director General

DEDICATORIA

A tí mi Dios, porque sin tí nada soy, por la certeza de que tú eres conmigo en donde sea que yo voy, porque tú vas luchando mis batallas delante de mí y por enseñarme que el principio de la sabiduría es el temor a tí, Jehová de los ejércitos.

A mi hermosa familia, porque ustedes me inspiran cada día y son más que importantes en mi vida, los amo:

A tí mom, por ser en toda la extensión de la palabra mi madre y por enseñarme a amar la vida.

A la memoria de mi Padre...aprendí tantas cosas de tí...en verdad te extraño mucho !!

A mis hermanas Cecy, Lore y Emma y a mi hermano Roberto, me son ejemplo vivo.

A mis cuñados Ismael, Ariel y Ramón, por la unión entre nosotros.

A mis preciosos chiquillos Eliud, Deyanira, Carlos, Magaly, Alán y Emma paulina, me llenan de alegría cada día.

A mi nana Pepe, eres muy linda nana.

Y claro, a tí gordito, soy muy feliz siendo tu esposa. Tú sabes cuanto te amo y que este logro también va para tí pues siempre has estado a mi lado. Aún nos esperan mayores triunfos...Te amo muchísimo...

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Por permitirme entrar por la puerta principal y encontrar la educación que se brinda en tan excelente institución.

A mi asesora, la Dra. Gloria Yepiz-Plascencia que con su gran ejemplo de entrega a su labor me ayudó todos los días de mi estancia en el laboratorio de Biotecnología Marina del CIAD. Gracias Gloria, en verdad eres muy especial para mi ! La palabras se me hacen pocas para decirte GRACIAS !

A los miembros de mi comité, Dr. Francisco Vargas-Albores, Dr. Rogerio Sotelo-Mundo y la Dra. María Islas-Osuna. Gracias Paco por tu participación en este proyecto y por los consejos que aun entre pasillos me diste. A Rogerio y Mary un especial agradecimiento por tan valiosa ayuda en el manejo de muestras enviadas a secuenciar al Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (LMSE) de la Universidad de Arizona, por la ayuda en el manejo de datos de secuencia y claro, por la amistad que encontré en ustedes.

Al Dr. Inocencio Higuera por la gran labor que realiza como Director General de nuestro querido CIAD, A. C. Hermosillo, Son.

Al Dr. Ramón Pacheco por su forma tan especial de recordarme que nunca debo perder de vista lo que quiero alcanzar. Con cariño y admiración !

A mis maestros que me guiaron hacia la búsqueda del conocimiento que ahora tengo.

Al CONACYT por el apoyo brindado al proyecto 36 926 B "La expresión de los genes de HDL-BGBP, SOD y catalasa como modelo molecular de estimulación en camarón".

A cada uno de mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología Marina y de generación ! aprendí mucho de cada uno de ustedes. Mil gracias por cada momento que compartimos, es grandioso contarlos entre mis amigos ! Ximena, con especial agradecimiento para ti por ayudarme en mi inicio en el manejo de técnicas de Biología Molecular.

Al Instituto Tecnológico de Sonora por la beca otorgada a través del convenio P/PROMEPI ITSON-99-06-01.

A la M. C. Laura E. Gassós O. por la amistad que tenemos y por hablarme del CIAD un buen día de su vida.

A la familia Reyna Campas por el apoyo con el que cuento desde el primer día que nos conocimos hasta la fecha.

Y por supuesto a ti mi Dios por la vida que gozo cada día al lado de mis seres más queridos, por la seguridad y la paz que tú me das en Cristo Jesús, por el plan que tuviste que un día yo te conociera y porque desde ese momento vivo y vivo para ti ! Gracias mi Señor !!!!!

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
OXIDACIONES BIOLÓGICAS	5
EFECTOS DAÑINOS DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	6
SISTEMA ANTIOXIDANTE Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA DETOXIFICACIÓN ..	7
ESTUDIOS DE CATALASA EN DIVERSOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	8
<i>Actividad de Catalasa y Resistencia al Estrés Oxidativo</i>	8
<i>Características de los Genes de Catalasa</i>	11
JUSTIFICACION	14
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE CATALASA	16
OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR.....	17
ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE PCR.....	17
OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES	18
<i>Ligación y Transformación</i>	18
<i>Análisis de Recombinantes por Medio de Electroforesis de DNA Superenrollado</i>	19
<i>Extracción de DNA Plasmídico de Recombinantes</i>	20
DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	22
SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA	22
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DE CATALASA DE <i>P. VANNAMEI</i>	24

<i>Secuenciación y Análisis de Secuencia del Clon 13 (pPVCAT-1)</i>	25
GENERACIÓN DE SONDAS HOMÓLOGAS MARCADAS POR PCR.....	26
<i>Sonda Marcada con Dígoxigenina</i>	26
<i>Sonda Marcada con ^{32}PdCTP</i>	27
AISLAMIENTO DE BANCO DE GENES DE CDNA DE HEPATOPÁNCREAS	28
<i>Preparación de la Bacteria Huésped e Infección</i>	29
<i>Réplica de DNA en Membrana e Hibridación con Sonda</i>	29
<i>Detección de Clones Potenciales en Película de Rayos X</i>	31
IN VIVO EXCISION.....	32
AISLAMIENTO DE RNA TOTAL PARA RACE, NORTHERN Y RT-PCR	33
DETECCIÓN DEL MRNA DE CATALASA	35
AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS DE CDNA	35
<i>Defosforilación</i>	36
<i>Remoción de la Estructura del Cap de los RNA Mensajeros</i>	36
<i>Ligación del Oligonucleótido de RNA</i>	37
<i>Transcripción Reversa</i>	38
<i>Amplificación de Extremos de cDNA y Reamplificación de Fragmentos de DNA por Nested PCR</i>	38
OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES RACE	42
<i>Análisis de Recombinantes y Extracción de DNA Plasmidico</i>	43
<i>Digestión de los Recombinantes RACE con EcoRI</i>	44
<i>Secuenciación y Análisis de Secuencia</i>	44
DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL MENSAJE DE CATALASA POR MEDIO DE NORTHERN BLOT.....	44
<i>Inmovilización de RNA Mensajero en Membrana</i>	46
<i>Generación de Sonda Homóloga Radioactiva Marcada por Random Primers</i>	46
<i>Hibridización de Sonda</i>	47
<i>Determinación del Tamaño del Mensaje de Hemocianina de P. vannamei</i>	48
<i>Determinación del Mensaje de Catalasa en Diferentes Tejidos por RT-PCR</i>	49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO INTERNO DEL cDNA DE CATALASA	51
AISLAMIENTO DEL cDNA A PARTIR DE UN BANCO DE GENES DE HEPATOPÁNCREAS	58
AISLAMIENTO DE RNA TOTAL PARA RACE, NORTHERN BLOT Y RT-PCR.....	60
<i>Confirmación del Mensaje de Catalasa.....</i>	<i>60</i>
AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS DE cDNA	61
<i>Obtención y Análisis de Recombinantes RACE.....</i>	<i>67</i>
<i>Secuenciación y Análisis de Secuencia.....</i>	<i>72</i>
LONGITUD DEL MRNA DE CATALASA POR NORTHERN BLOT	73
<i>Expresión del gen de catalasa</i>	<i>79</i>
CONCLUSIONES.....	86
APÉNDICE.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	90

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de DNA de catalasa e identificación de recombinantes.....	53
Fig. 2. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de la caracterización del fragmento de 0.9 Kb con enzimas de restricción.....	54
Fig. 3. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % del fragmento de 660 pb.	62
Fig. 4. Análisis electroforético de los clones potenciales positivos en el aislamiento de banco de genes.....	63
Fig. 5. Análisis electroforético de RNA total de diferentes tejidos y RT-PCR de catalasa.....	65
Fig. 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % de ampliificaciones RACE.....	66
Fig. 7. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de ampliificaciones RACE y Nested.....	68
Fig. 8. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de ampliificaciones RACE.....	69
Fig. 9. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % de recombinantes RACE.....	70
Fig. 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de la digestión con <i>EcoRI</i> de los recombinantes RACE.....	71
Fig. 11. Estrategia de secuenciación del cDNA de catalasa de <i>P. vannamei</i>	74
Fig. 12. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de catalasa de <i>P. vannamei</i>	76
Fig. 13. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre catalasa de <i>P. vannamei</i> y otros organismos.....	78
Fig. 14. Northern blot para RNA de catalasa.....	82
Fig. 15. Análisis electroforético de fragmentos de cDNA de hemocianina y Northern blot.....	83

- Fig. 16.** Análisis electroforético de la expresión del mensaje de catalasa contra una proteína constitutiva..... 84
- Fig. 17.** Análisis electroforético en agarosa al 1 % de las ampliaciones por RT-PCR con cDNA de hemocitos y hepatopáncreas y oligonucleótidos específicos CatnFw y CatnRv. 85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos utilizados	55
Tabla 2. Longitud de las secuencias generadas del fragmento de 0.9 Kb (clon pPVCat-1) y similitud con catalasas de otros organismos	57
Tabla 3. Concentración y rendimiento del RNA total extraído de hepatopáncreas, branquias y músculo.....	64
Tabla 4. Porcentajes de identidad y de identidad mas reemplazos conservados entre catalasa de <i>P. vannamei</i> y de otros organismos.	80

RESUMEN

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una óxido-reductasa que convierte el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua de acuerdo con la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalasa} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Esta enzima está involucrada en la defensa contra daño oxidativo por peróxido de hidrógeno (Sanford & Katz, 1989).

La catalasa es una enzima altamente conservada que se ha estudiado en bacterias, plantas, vertebrados y algunos insectos. En crustáceos decápodos, la información sobre catalasa es aún muy limitada, es por ello, que el objetivo general de este trabajo fue el aislar y caracterizar el cDNA de catalasa de camarón blanco *Penaeus vannamei* y detectar su expresión. La estrategia de clonación se inició con una amplificación por PCR a partir de un banco de genes de hepatopáncreas y utilizando oligonucleótidos degenerados correspondientes a regiones altamente conservadas en las catalasas. El fragmento amplificado de 0.9 Kb se clonó y secuenció para confirmar la identidad de catalasa. Este fragmento se utilizó como sonda para realizar un cribado de banco de genes por hibridación y de esta manera obtener el cDNA completo, sin embargo, esta estrategia no fue exitosa.

Por lo anterior, se utilizó la estrategia conocida como Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE) utilizando RNA total aislado de hepatopáncreas y oligonucleótidos específicos. Se logró amplificar, clonar y secuenciar los dos extremos faltantes del cDNA de catalasa, de tal manera que se obtuvo una secuencia continua con un marco de lectura abierta. La secuencia nucleotídica del cDNA completo de catalasa caracterizado es de 1698 pb, compuesto por 78 pb en la región 5'- no traducida (5'-UTR), 1515 pb en la secuencia codificante y 105 pb en la región 3'- no traducida (3'-UTR). La secuencia deducida de aminoácidos contiene 505 residuos que forman un polipéptido (subunidad) con peso molecular calculado de 57.267 kDa y pI de 7.0. La secuencia de aminoácidos de la catalasa de camarón blanco tiene una alta similitud con otras catalasas, con los valores más altos con el homólogo de puerco *Sus scrofa* con 71 % de identidad, de humanos *Homo sapiens* con 69 %, mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* con 66 %, con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* con 59 % y con la bacteria *Bacillus subtilis* con 55 %.

con 69 aminoácidos, Inosita de la fruta *Drpsophi/a melallogoster* con 66 aminoácidos, con el número de aminoácidos ('aenor/a/d/l/s *elegans* con 59 aminoácidos y con la bacteria *llacil/lis .rnhti/is* con 55 aminoácidos. Los aminoácidos involucrados en la síntesis por catalización son histidina, asparagina y tirosina y fueron irremplazados en absoluto a su absoluta conservación y su localización en las secuencias correspondientes, encontrándose en la posición 71 la histidina, en la 141 la asparagina y en la 354 la tirosina de la secuencia de aminoácidos (de derivación),

El mRNA fue sintetizado por medio de RT-PCR en el ptopáctico y hclucitos y branquia. Usando Northern blots se detectó una señal que correspondió a un mRNA más pequeño que el tamaño esperado en busca de un cDNA. Si esta mRNA corresponde a mRNA parcialmente (fugado) o es una migración normal debido a las estructuras secundarias del RNA, debido a ser inducido en estudios de laboratorio. En consecuencia, este trabajo plantea la caracterización del cDNA de la enzima codificada del sistema de defensa y se reporta la expresión en tres tejidos (leucocitos, hclucitos y branquia).

INTRODUCCION

Una de las actividades productivas del sector primario en México es la producción de camarón, la cual ha adquirido importancia debido a la alta cantidad de divisas que se generan como consecuencia de su exportación (Castro, 2000). Además, esta actividad genera empleos y es una fuente de alimento, por lo que ha aumentado su importancia para el desarrollo del País (Martínez-Córdova, 1993) En México, los principales estados productores de camarón silvestre son Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (<http://semarnap.gob.mx/ssppesca/anua97/c97a04.html>, SEPESCA).

La población mundial sigue aumentando y como consecuencia se manifiesta una mayor demanda de alimentos y de camarón (<http://www.shrimpfarm.net/FutureofShrimp.html>). La producción mundial de camarón por captura silvestre y cultivado en el ciclo de 1990 a 1997 alcanzó 3.5 millones de toneladas según estadísticas de la FAO. Esto corresponde a un incremento de 32% respecto a la producción obtenida hasta 1990 y ocupa un 20% de la producción mundial en el mercado de los mariscos (Josupeit, 1999).

En la producción de camarón, la pesca artesanal e industrial juegan un papel importante (Castro, 2000). Sin embargo, la protección de camarón cultivado es cada vez más importante. En el ciclo de 1985 a 1995, se estimó que existían aproximadamente 50,000 granjas de cultivo a nivel mundial, ocupando casi 1.2 millones de hectáreas (<http://www.fishfarming.com/shrimp.html>). De esta manera, el cultivo de camarón se establece en el contexto global de producción alimentaria, así como en el manejo de recursos acuáticos y desarrollo socioeconómico; por lo que se le considera como un área de prioridad (<http://www.blacksci.co.uk/~cgilib/bookpage.bin?File=651>). Entre las especies de importancia en acuicultura están *Penaeus monodon* (camarón tigre negro gigante), *Penaeus chinensis* (camarón blanco chino) y *Penaeus vannamei* (camarón blanco occidental).

Como consecuencia del éxito del cultivo de camarón, ya no basta con entender los factores ambientales para la optimización del mismo, sino también es necesario estudiar los procesos metabólicos y de protección molecular (Rudneva, 1999). Uno de los sistemas de protección es el sistema antioxidante que incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión reductasa y tioredoxina reductasa (Rudneva, 1999). La catalasa es una enzima que protege contra daño oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno (Sanford, 1989), el cual es producto del metabolismo oxidativo (Wheeler *et al.*, 1995). Por lo anterior, en la siguiente sección se presenta información sobre la importancia, forma de acción y otros estudios relevantes sobre catalasa.

ANTECEDENTES

Oxidaciones Biológicas

El metabolismo oxidativo genera de forma continua especies de oxígeno reducidas parcialmente, las cuales son altamente tóxicas por su gran reactividad (Mathews & Holde, 1995). En este proceso, el oxígeno es el aceptor final de electrones (Alberts, 1994). La reducción total de una molécula de oxígeno requiere de cuatro electrones. La reducción de oxígeno con un electrón produce radical superóxido, la adición de un electrón más da lugar a peróxido de hidrógeno y un tercer electrón produce un radical hidroxilo y con un cuarto electrón se obtiene oxígeno y agua. Los radicales hidroxilos son extremadamente tóxicos. Todas estas especies se producen intracelularmente y se tienen que convertir a formas menos dañinas para que el organismo sobreviva (Mathews & Holde, 1995).

En los peroxisomas se lleva a cabo una versión modificada de la β -oxidación. Estos organelos se encuentran presentes en prácticamente todas las células (Mathews & Holde, 1995) y realizan oxidación de lípidos, generalmente de cadena larga (Figuroa *et al.*, 1997) como C22:1 (Ames, 1983) y detoxificación de otros metabolitos como alcoholes y fenoles. En esta ruta, el flavín adenín dinucleótido reducido (FADH₂) unido al acilCoA no transfiere electrones a la cadena respiratoria, sino directamente al oxígeno, mismo que es reducido a peróxido de hidrógeno. Esta ruta no está asociada con la producción de energía pero sí produce calor (Mathews & Holde, 1995).

Efectos Dañinos del Peróxido de Hidrógeno

Durante el metabolismo aeróbico, la reducción completa del oxígeno molecular en agua se lleva a cabo por una reducción secuencial. Este proceso ocurre por la aceptación de cuatro electrones, uno a la vez (Mackay & Bewley, 1989) que genera los productos mencionados y que se conocen como especies reactivas de oxígeno. Una vez que estos oxidantes se forman *in situ* en ambientes aeróbicos, reaccionan inmediatamente con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Amstand *et al.*, 1991). Estas reacciones propician la oxidación de lípidos, la inactivación de enzimas, cambios en el DNA y daños a organelos, afectando la integridad estructural y funcional de la célula (Mackay & Bewley, 1989). De esta manera, se ha relacionado el efecto y aumento de estos radicales libres con el envejecimiento (Orr *et al.*, 1996), carcinogénesis y aberraciones cromosomales (Glenn, 1986).

Los radicales hidroxilos dañan al DNA rompiendo las hebras y aunque las hebras sencillas se pueden reparar, no es el caso de las hebras dobles y por lo tanto la célula muere al no poder replicar los cromosomas. También ocurre una alteración de bases como la 8-hidroxiguanina, timinglicol, y 5-hidroximetiluracil. Estas modificaciones son mutagénicas ya que alteran las propiedades de apareamiento por complementariedad de bases conduciendo a errores en la replicación del DNA cuando los daños exceden la capacidad de reparación celular (Mathews & Holde, 1995).

A pesar de los efectos dañinos que tienen estos oxidantes, no siempre son indeseables, como es el caso de células blancas que realizan fagocitosis por endocitosis de células infecciosas. A este efecto le sigue un incremento respiratorio con una alta toma de oxígeno estimulado por mecanismos que todavía no son aún claros. Mucho de este oxígeno se reduce a superóxido y peróxido de hidrógeno, contribuyendo a la eliminación de la célula endocitada (Mathews & Holde, 1995).

Sistema Antioxidante y Moléculas Involucradas en la Detoxificación

Debido a los éxitos obtenidos en cultivos marinos, cada vez existe más interés por entender los factores ambientales necesarios para optimizar la sobrevivencia de los organismos. De igual forma, se busca entender los mecanismos de adaptación y resistencia, basados en procesos metabólicos y sistemas moleculares de protección (Rudneva, 1999).

Los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de defensa para eliminar las especies reactivas de oxígeno (Grissold *et al.*, 1993). Entre los compuestos antioxidantes no enzimáticos están el glutatión, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (Mathews & Holde, 1995). Por su parte, el sistema enzimático incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión reductasa y tioredoxina reductasa (Rudneva, 1999). La SOD convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno (Davison *et al.*, 1984) y a su vez la catalasa convierte al peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua (Kashiwagi *et al.*, 1997), (Visick & Ruby, 1998). La glutatión reductasa y la tioredoxina reductasa transfieren equivalentes reductores a través del intercambio de disulfuros con el glutatión y la proteína tioredoxina, usando como donador primario al NADPH. Los productos de la reacción actúan como antioxidantes intracelulares (Missirlis *et al.*, 2001).

La catalasa es una óxido-reductasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua de acuerdo con la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalasa} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. De acuerdo con el número de recambio de esta enzima, la conversión del sustrato a producto se da a una velocidad de 40 millones de moléculas de sustrato por cada molécula de catalasa por segundo (Garret & Grishman, 1995). De esta forma previene la formación del radical hidroxilo que es altamente dañino.

Estudios de Catalasa en Diversos Sistemas Biológicos

La catalasa es una hemoproteína (Garret & Grishman, 1995) formada por 4 subunidades idénticas que se encuentra en organismos aeróbicos (Wu & Shah, 1995) tanto procarióticos como eucarióticos (Kashiwagi *et al.*, 1997). La catalasa y los efectos de su acción ha sido estudiados por más de 150 años. Se ha tratado de conocer la organización estructural a nivel de gen y proteína, así como los efectos de su acción en diversos organismos como se describe a continuación.

Un número significativo de secuencias de catalasa se ha reportado, entre ellas están catalasas de bacterias, plantas, hongos y animales (Klotz *et al.*, 1997). Las subunidades de catalasa tienen tamaños similares con peso molecular entre 50 y 69 kDa. La más pequeña corresponde a *Bacillus firmus*, mientras que la catalasa de tamaño mayor corresponde a *Escherichia coli* (HPII) con polipéptidos formados por 448 y 753 aminoácidos, respectivamente. El promedio de aminoácidos para catalasas de animales es de 515 aminoácidos (García *et al.*, 2000).

Actividad de Catalasa y Resistencia al Estrés Oxidativo

Existen algunos estudios que demuestran el papel esencial de la catalasa, por ejemplo, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* el único mecanismo de defensa enzimático para la eliminación de peróxido de hidrógeno es la acción de catalasa. De hecho, se ha reportado que el aumento de catalasa por sobreexpresión favoreció la protección manifestándose en un ligero incremento de tiempo de vida del 10 % con respecto a moscas control hasta antes del día 49 del estudio, después del cual el comportamiento fue el mismo tanto para la muestra como para el control (Orr & Sohal, 1992).

También se han hecho estudios sobre tolerancia a H₂O₂ por actividad de catalasa en moscas silvestres así como en moscas con defectos en el gen de catalasa. Las moscas silvestres toleran hasta 1 % de H₂O₂. Esto contrasta con el efecto mostrado en mutantes del tipo amórfico (cepa *Cat^{am}* sin actividad de la enzima) e hipomórficos

(cepa *Cat^{m2}* con un 5 % de actividad de la enzima) que mostraron fenotipo hipersensible a las misma concentración de H₂O₂. No obstante, la cepa *Cat^{m2}* mostró ser dos veces más resistente que la cepa *Cat^{m1}*. Estas observaciones sugieren que aún niveles bajos de actividad de catalasa son suficientes para contrarrestar el efecto letal que se ha asociado con el H₂O₂ (Mackay & Bewley, 1989).

En otro experimento, se sobreexpresó la Cu-Zn SOD simultáneamente con catalasa. Cuando se estudiaron moscas transgénicas conteniendo una copia extra de los genes que codifican para estas dos enzimas, se observó un aumento del 26 % en la actividad de la Cu-Zn SOD y un 73 % en la actividad de catalasa. La concentración de H₂O₂ en mitocondria en este tipo de moscas fue 2.5 veces menor que en los controles; más aún, el vigor de las moscas transgénicas no se perdió en el tiempo de vida promedio (Sohal *et al.*, 1995).

Además, el tiempo necesario para mortandad del 50%, 90% y 100% en la línea transgénica, fue de 14.5, 9 y 14 días más que el control (Orr & Sohal, 1994). De esta manera, los resultados indican que cuando las enzimas Cu-Zn SOD y catalasa se sobreexpresan simultáneamente, se disminuye el daño oxidativo (Sohal *et al.*, 1995) funcionando como una estrategia eficiente para incrementar el tiempo de vida (Orr & Sohal, 1994).

A pesar de que el estudio de la sobreexpresión de las enzimas Cu-Zn SOD y catalasa apoya la idea de que el estrés oxidativo es una de las causas del envejecimiento, se debe tener cuidado al hacer declaraciones relacionadas a la extensión de tiempo de vida, ya que el retraso del envejecimiento no se debe basar solamente en comparaciones de cuánto tiempo vive, sino también en otras condiciones ambientales que determinen estados fisiológicos (Sohal *et al.*, 1995).

En otro estudio realizado con células de ratón se sobreexpresó SOD y catalasa (Amstutz, 1991), se observó que el balance entre estas enzimas es necesario. Se utilizaron clones denominados SOD 15 y SOD 3 con incrementos de 2.3 y 3.6 veces la actividad de la enzima, respectivamente, mientras que el clon el SOCAT 3 tiene tres veces la actividad de catalasa y 1.7 veces la actividad de Cu-Zn SOD. Los

transfectados SOD 15 y SOD 3 fueron sensibles a la presencia de superóxido, manifestándose en rompimiento de cadenas sencillas de DNA, retraso en el crecimiento y muerte, mientras que los transfectados SOCAT 3 fueron resistentes, mostrando protección contra estrés oxidativo debido al aumento de la catalasa. Es decir, elimina los productos de la acción de SOD, por lo que la acción de las dos enzimas es necesaria para la protección contra antioxidantes (Amstand, 1991).

El efecto del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento también se ha estudiado en el nemátodo *Caenorhabditis. elegans* que puede vivir hasta 3 semanas dependiendo del régimen nutricional. Comparado con el humano, un organismo de 1 semana de vida es equivalente a un adulto joven; de 2 semanas es equivalente a humanos de 45 a 65 años y de 3 semanas a personas ancianas. En este organismo se vió que en mutantes de larga vida y en organismos control la actividad de la catalasa aumenta conforme a la edad; sin embargo el control manifestó un decremento a la tercer semana de vida, mientras que el mutante mantuvo el aumento de actividad enzimática aún a la tercer semana de vida. Transcurrido el tiempo de experimentación los valores de unidades de actividad fueron 102.1 para el mutante y 53.1 para el control (Vanfleteren, 1993), relacionando así la longevidad con la actividad de catalasa.

C. elegans se utiliza como un sistema modelo de estudio ya que su ciclo de reproducción es rápido. Se han demostrado incrementos en los tiempos de vida bajo dos condiciones: mutación en el gen *age-1* y condiciones de adversidad. Aunque la vida de este nemátodo es alrededor de 2.5 semanas, cuando está en condiciones de escasez de alimento, entra a un estadio en el que puede vivir meses sin afectar su vida después de este período. Este tiempo se ha definido como "estadio de no envejecimiento" (Larsen, 1993).

Se han hecho mutaciones en el gen *age-1*, sin embargo, la función exacta de su producto todavía no se conoce (Larsen, 1993), aunque el modelo propuesto predice que el producto normal del gen *age-1* es una proteína que reprime la actividad de otros genes como una función de la edad (Vanfleteren, 1993). Es por ello que se

evaluó la resistencia contra peróxido de hidrógeno y la actividad de SOD y catalasa en organismos denominados TJ401 mutantes del gen *age-1* y en estado de escasez de alimento para determinar si existen variaciones bioquímicas consistentes con el incremento de defensa contra el daño oxidativo. Los animales TJ401 son hiperresistentes al peróxido de hidrógeno y también mostraron incremento en la actividad de SOD y catalasa. De esta manera, según Larsen (1993) se puede pensar que el producto del gen *age-1* regula negativamente a la SOD y catalasa, lo que puede apoyar la teoría del envejecimiento por radicales.

También se ha mostrado que el nemátodo *C. elegans* tiene un gen denominado *ctl-1* que codifica para una catalasa poco usual. El mRNA que proviene de este gen aumenta en cantidad cuando la larva se encuentra en condiciones de escasez de alimento. Se piensa que *ctl-1* es necesario para extender los tiempos de vida bajo estas condiciones, ya que mutantes *age-1* mostraron un incremento en la actividad de catalasa y en la actividad locomotora, mientras que en los animales control se observó un decremento en la actividad de catalasa asociado con señales de envejecimiento, tales como disminución de movimiento y de capacidad de alimentación (Taub *et al.*, 1999).

Características de los Genes de Catalasa

El gen de catalasa de *D. melanogaster* es posiblemente el más estudiado en invertebrados. El transcrito de este gen contiene una secuencia de 1365 pares de bases corriente arriba del sitio de iniciación de la traducción y una secuencia de 1423 corriente abajo del codón de terminación. El gen de la catalasa en *D. melanogaster* está compuesto de tres exones que codifican para secuencias de 19, 307 y 180 aminoácidos y están separados por intrones de 3520 y La región del promotor de catalasa es similar al de la Cu-Zn superóxido dismutasa, haciendo suponer que ambas enzimas se regulan de forma semejante (Orr *et al.*, 1996). Con clones de DNA genómico de catalasa (Cat^+) de *D. melanogaster* se logró localizar la región de transcripción en un fragmento de 5.5 kb y el análisis de secuencia también mostró que consiste de tres exones como fue anteriormente reportado (Orr *et al.*, 1996). Para

verificar el tamaño del transcrito de Cat⁺ y su abundancia, se analizaron por Northern blot los niveles de mRNA en embriones y adultos. Se detectó un transcrito de 2.2 kb para ambos casos. Además, para estimar la cantidad de catalasa, la cual es producto de este mRNA, se utilizaron embriones de 0-2 horas y de 0-18 horas. La actividad de catalasa en embriones fue menor en los más jóvenes con valores de 4% comparado con un 10% en los organismos de 0-18 horas, asumiéndose que la actividad aumenta con el tiempo (Griswold *et al.*, 1993).

También se ha visto que el producto primario de la traducción del gen de catalasa tiene el mismo tamaño que la proteína madura, identificada por análisis de Western blot en extractos protéicos de moscas y por marcaje radioactivo *in vivo* seguido de una inmunoprecipitación. Estos resultados son consistentes con los datos mostrados para catalasa de peroxisomas de levadura e hígado de rata, para los cuales, el producto de la traducción tanto *in vivo* como *in vitro* son los mismos (Glenn, 1986). También fue posible determinar la tasa de síntesis de la catalasa, haciendo uso del compuesto 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Este compuesto es un inhibidor no competitivo que se une a la apoenzima de la catalasa y forma un complejo irreversible además de destruir a la enzima existente sin afectar la síntesis *de novo*. De esta manera, la proporción de actividad de la enzima que reaparece es directamente proporcional a la tasa de síntesis *de novo* (Glenn, 1986).

Otro dato interesante es que la complementación de mutantes alélicos en *D. melanogaster* se puede atribuir a una asociación de polipéptidos de mutante/mutante y/o mutante/silvestre que provoquen un cambio conformacional que de lugar a una restauración parcial de la actividad de la enzima. Esto es una posibilidad de obtener material genético para crear especies con niveles de actividad de catalasa que varían de 0 a 100 %, los cuales se pueden usar para evaluar el efecto de protección durante condiciones de estrés oxidativo (Mackay & Bewley, 1989).

El gen *ctl-1* de *C. elegans* codifica para una enzima citosólica mientras que el gen *ctl-2* codifica para una enzima peroxisomal. Ambos cDNAs se obtuvieron a partir de un banco de genes de cDNA. Los productos de estos genes fueron idénticos en un 82%. La enzima CTL-2 tiene una variante conservada (SHI) descrita como secuencia

de localización hacia los peroxisomas, mientras que la CTL-1 no la tiene (Taub *et al.*, 1999). Para determinar la localización subcelular de estas dos catalasas, se fusionó el gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*) con el extremo 5' de la región codificante del gen de ambas catalasas. De la forma esperada, la expresión de la fusión *gfp::ctl-2* fue visible en los peroxisomas, mientras que la fusión *gfp::ctl-1* se localizó en el citosol (Taub *et al.*, 1999).

A partir de información generada por Taub (1999) se puede decir que la catalasa puede ser utilizada como marcador de organelos, como se describió anteriormente para el erizo de mar *Tetrapigus niger* (Figueroa *et al.*, 1997). En este caso, se buscó la localización subcelular de catalasa como marcador en los gametos de este organismo, con la intención de apoyar la hipótesis de la biogénesis de peroxisomas. Dicha hipótesis postula que estos organelos no se forman *de novo* sino que se generan a partir de organelos ya preexistentes; por lo que fue necesario demostrar la presencia de catalasa en por lo menos uno de los gametos. Para esto utilizó inmunomicroscopía y western blot y los resultados mostraron la presencia de estructuras del tipo de peroxisomas en los huevos del erizo y la presencia de catalasa citosólica en espermatozoides, demostrando que los peroxisomas de las células embrionarias se derivan de los peroxisomas de los oocitos.

JUSTIFICACION

En el nemátodo *C. elegans* y el insecto *D. melanogaster* se ha estudiado el estrés oxidativo y a la catalasa, cuya función es contrarrestar el efecto tóxico que producen compuestos como el H_2O_2 . En el erizo de mar *Tetrapigus niger* la catalasa se ha utilizado como marcador de peroxisomas (Figueroa et al., 1997).

En crustáceos son pocos los estudios, uno de ellos hecho por Rudneva (1999) reporta la actividad de catalasa en *Artemia* sp y en camarón *Palaemon adspersus*. La presencia de catalasa en el mayor órgano metabólico, el hepatopáncreas, ha sido confirmada en *Macrobrachium malcolmsoni*, aunque también se detectó en músculo y branquias pero en menor proporción (Arun & Subbramanian, 1998). Por otro lado, la producción de radical superóxido, el cual es una especie reactiva de oxígeno, se midió en hemocitos de *P. vannamei* después de ser estimulados con agentes extraños (Muñoz et al., 2000), lo que indica que la catalasa se encuentra en varios tejidos como se ha demostrado por inmunolocalización en moluscos y crustáceos (Orbea et al, 2000).

Aunque existen reportes sobre la catalasa de invertebrados, incluyendo especies modificadas genéticamente, en organismos marinos como el camarón se tiene información limitada. Además, con la creciente demanda de este crustáceo, ya no basta con entender los sistemas de ingeniería para la producción del mismo, sino que también ha surgido el interés por entender los mecanismos de defensa como lo es el sistema contra estrés oxidativo. Lo anterior hace necesario realizar estudios sobre enzimas antioxidantes en camarón, por lo cual se propone aislar y caracterizar el cDNA de catalasa de camarón blanco *P. vannamei*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar el cDNA de catalasa de camarón blanco *P. vannamei* para deducir su estructura primaria y detectar su expresión en diferentes tejidos.

Objetivos Particulares

- Amplificar por PCR un fragmento correspondiente a regiones conservadas de catalasa
- Clonar y secuenciar el fragmento de PCR.
- Aislar y secuenciar el mensaje completo de catalasa a partir de un banco de genes de cDNA de hepatopáncreas.
- Detectar el mRNA de catalasa por medio de RT-PCR en tejidos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento y la posterior caracterización del cDNA de catalasa de camarón blanco *P. vannamei*, la búsqueda se hizo en un banco de genes de hepatopáncreas. Este banco de genes fue construido previo a este estudio por la Dra. Gloria Yepiz-Plascencia. Actualmente se mantiene en el laboratorio de Biotecnología Marina del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Hermosillo, Sonora, México.

Diseño de Oligonucleótidos de Catalasa

Los oligonucleótidos degenerados se diseñaron a partir de secuencias conservadas obtenidas mediante la alineación de las secuencias aminoacídicas de catalasas de humano (*Homo sapiens*) y de la mosca de la fruta (*D. melanogaster*), obtenidas de GenBank (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con número de acceso NP_001743 y P17336, respectivamente.

Los aminoácidos que se consideraron son FGYFEVTHDI para el oligonucleótido sentido (CATs) y corresponde a los aminoácidos 82 al 91 de *H.sapiens* y 80 al 89 de *D. melanogaster*. Los aminoácidos que se consideraron para el antisentido (CATas) son NYLHIPVNCP que corresponden a los aminoácidos 369 al 378 de *H. sapiens* y 367 al 376 de *D. melanogaster*. Ambas secuencias se tradujeron a sus correspondientes nucleótidos para ser sintetizados químicamente. La secuencia antisentido se tradujo a reverso complemento y a ambas se les añadió la secuencia nucleotídica que corresponde al sitio de restricción de la enzima *Xho*I en el extremo 5'.

Obtención de Fragmentos de DNA por PCR

Utilizando los oligonucleótidos antes mencionados, se amplificó un fragmento interno de 900 pb del cDNA de catalasa de camarón. El banco de genes de cDNA de hepatopáncreas se usó como molde y las condiciones finales de la reacción fueron: buffer PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, pH 8.3), mezcla de dNTPs 0.25 mM cada uno, oligonucleótido sentido (CATs) y antisentido (CATas) aproximadamente 0.5 μM cada uno, *Taq* DNA polimerasa 2.5 U (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, EUA), 4 μl de cDNA de banco de genes (título de 1.1×10^9 pfu/μl) en 50 μl. Los componentes se mezclaron y se adicionó 40 μl de aceite mineral y la reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (DNA Thermal Cycler, modelo 480, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C, 3 min; 55°C, 1 min; 72°C, 3 min por 1 ciclo; 94°C, 3 min; 42°C, 1 min; 72°C, 3 min por 1 ciclo; 94°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 3 min por 33 ciclos; 72°C 10 min; 4°C. Estas condiciones de corrida se denominará de aquí en adelante como programa 1.

Análisis del Producto de PCR

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando buffer TAE 1X (50 X: 242 g Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0 por litro). El aceite mineral se eliminó y se analizaron 30 μl de la reacción a la cual se añadió buffer carga 6X para DNA (0.15% azul de bromofenol, 0.15% de xilencianol y 33% de glicerol) (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Como estándar de tamaño se utilizó 1 μg de 1 Kb DNA ladder (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 y 75 pb); (Gibco BRL, Gaithersburg MD, EUA). El gel se corrió a 65 volts hasta que el colorante azul de bromofenol recorrió un 75 % del gel.

El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 2 minutos y se lavó con agua destilada por 10 minutos. Las bandas se detectaron utilizando un transiluminador de luz de UV modelo TFX-35M (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, EUA) y se fotografiaron con una cámara digital EDAS DC120 Zoom (Kodak, Rochester, NY).

Obtención de Recombinantes

La clonación del producto amplificado por PCR se realizó según la técnica de pGEM-T Easy Vector System 1 (Promega, Madison, WI), el cual consiste básicamente en la obtención de recombinantes utilizando un vector plasmídico preparado por digestión con la enzima de restricción *EcoRV* y además contiene timidina terminal en el extremo 3'. Este vector es de alto número de copias, resistente a ampicilina, tiene sitios múltiples de restricción y regiones promotoras que flanquean al sitio múltiple de clonación (SMC). Este sistema tiene el gen *lacZ* que al ser interrumpido por inserción del fragmento de DNA es inactivado, facilitando la identificación de recombinantes.

Ligación y Transformación

Para la ligación del producto de PCR al vector se utilizó 1 µl de T4 DNA ligasa (3 U/µl), en solución de Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 50%; 5 µl del buffer de ligación rápido 2X, (Tris-HCl 60 mM pH 7.8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 1 mM, PEG 10%); 50 ng del vector pGEM-T Easy, 3 µl del producto de PCR, en volumen de reacción de 10 µl. Para el control positivo, a la reacción de ligación se le añadieron los mismos componentes a excepción del DNA producto de PCR, y en lugar de éste se adicionó 2 µl de DNA control de 542 pb con deoxiadenosina terminal. Los componentes se mezclaron y se incubó toda la noche a 4°C.

Después de la incubación, las reacciones de ligación se centrifugaron 15 segundos a $13,200 \times g$ y se agregaron 3 μ l de cada una de ellas a 50 μ l de células TOP 10 F' *E. coli* competentes One Shot del sistema TOPO TA Cloning Version J (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Esta mezcla se incubó en hielo por 20 minutos y luego se aplicó choque-térmico a las células por 45-50 segundos en un baño de agua a 42°C sin mezclar, inmediatamente después se incubó en hielo por 2 minutos y se le añadieron 200 μ l de medio SOC (SOB conteniendo glucosa 20 mM) y se incubó sobre una superficie horizontal a 37°C por 1.5 h con agitación a 250 rpm en un agitador Lab-Line modelo 3527 (Lab-line, Melrose Park, IL, EUA).

Posteriormente, se esparcieron volúmenes de 75 y 175 μ l tanto para la muestra como para el control, sobre la superficie de dos placas de LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-ampicilina (100 μ g/ml), conteniendo 40 μ l por placa de IPTG 100 mM (isopropil- β -D-tiogalactósido) y 40 μ l por placa de X-gal 40 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido). Las placas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 18 hr hasta que las colonias fueron visibles.

Análisis de Recombinantes por Medio de Electroforesis de DNA Superenrollado

Para el análisis de clones potenciales positivos se seleccionaron 14 colonias blancas. Cada colonia fue picada con un palillo de madera estéril y se inoculó en 1 ml de caldo de cultivo SOB (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05 %, KCl 2.5 mM, pH 7, MgCl₂ 0.01 M) conteniendo ampicilina 100 μ g/ml y se hizo una réplica de cada colonia en placas con medio LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 2.0 %, pH 7)-ampicilina (100 μ g/ml). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y los cultivos líquidos se incubaron con agitación (250 rpm) a 37°C en un agitador hasta tener el cultivo en fase estacionaria (12-18 hr).

Se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a $16000 \times g$ en una centrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Hamburg, Alemania) a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó en cloro al 10%. El pellet se resuspendió en 100 μ l de buffer TE (Tris-

HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se mezcló vigorosamente en un vórtex (Thermoline, Debuque, IA, EUA). A cada muestra se le agregó 100 μ l de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló en vórtex.

Las muestras se centrifugaron por 1 minuto 16000 x g a temperatura ambiente y se recuperó 10 μ l de la fase superior acuosa de cada muestra a los cuales se les agregó 2 μ l de buffer muestra 6X para DNA (Sambrook *et al.*, 1989). El control negativo fue DNA de una colonia azul que corresponde a la ligación intramolecular del vector. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X incluyendo 1 μ g de estándar de DNA superenrollado Supercoiled DNA ladder (16120, 14174, 12138, 10102, 8066, 7045, 6030, 5012, 3990, 2972 y 2067 pb); (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). De forma separada se trabajaron 25 colonias azules provenientes de las mismas placas de donde se tomaron las colonias blancas y se les dio el mismo tratamiento que a éstas últimas.

Extracción de DNA Plasmídico de Recombinantes

El DNA plasmídico de los posibles clones positivos seleccionados, se aisló según la técnica de extracción alcalina rápida (Yepiz-Plascencia, 2000). Las colonias recombinantes se sembraron en 5 ml de SOB-MgCl₂ 0.01 M-Ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Se transfirió 1.5 ml de cultivo a un microtubo y se centrifugó por 5 minutos a 12000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó en cloro al 10% y el pellet se resuspendió en 250 μ l de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8) y se mezcló en un vórtex. A estas muestras también se les adicionó 250 μ l de solución II recién preparada (SDS 1%, NaOH 0.2 N), se mezcló en un vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de la incubación se agregó 50 μ l de solución III (acetato de potasio 3 M, pH 5.2), se mezcló en un vórtex y se incubó por 15 minutos en hielo y se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g a temperatura

ambiente. El sobrenadante (aproximadamente 700 μ l) se transfirió a un microtubo nuevo y se agregó 700 μ l de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló en un vórtex.

La solución se centrifugó por 30 minutos a temperatura ambiente a 12000 x g. El pellet se lavó con 300 μ l de etanol al 70% frío, se centrifugó por 5 minutos y se removió el etanol por decantación, teniendo cuidado de no perder el pellet. El lavado con etanol al 70% se repitió un vez más y el pellet se secó en un SpeedVac y se resuspendió en 50 μ l de agua deionizada estéril y se añadió 1 μ l de ribonucleasa RNasa A (10 mg/ml). Este DNA plasmídico se utilizó para digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación en un secuenciador automático ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), como un primer acercamiento hacia la caracterización del fragmento clonado.

Para obtener un DNA plasmídico de mayor pureza, se utilizó el DNA previamente obtenido y se le agregó 350 μ l de agua deionizada estéril y se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando cada vez a 16000 x g por 2 minutos y se recuperó la fase superior acuosa. El sobrenadante se extrajo con un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), y al sobrenadante acuoso se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. Las muestras se incubaron 1 h a -20°C y se centrifugaron a 16000 x g por 30 minutos a 4°C . Los pellets, se lavaron con etanol al 70% frío, centrifugando por 5 minutos a 16000 x g y cada pellet se resuspendió en 30 μ l de agua deionizada estéril. El DNA plasmídico se digirió con la enzima *Apal* (10 U/ μ l, Gibco BRL Gaithersburg, MD, EUA) y se analizó en un gel de agarosa al 1.2 %.

Digestión con Endonucleasas de Restricción

La región de múltiple clonación del vector pGEM-T Easy está flanqueado por tres sitios de restricción (*EcoRI*, *BstZI* y *NotI*) que permiten digestiones simples para la liberación del fragmento clonado. Las enzimas *EcoRI* y *NotI* (Gibco BRL Gaithersburg, MD, EUA) se utilizaron para digerir el DNA plasmídico obtenido por extracción alcalina rápida. Se tomó 3 µl de DNA plasmídico del clon 7 y se incubó con 0.5 µl de la enzima *EcoRI*, *NdeI*, *SacI*, (10 U/µl) (Gibco BRL Gaithersburg, MD, EUA) respectivamente y de forma separada 3 µl de DNA plasmídico del clon 13 con 0.5 µl de la enzima *NotI* (15 U/µl), *EcoRI*, *ApaI*, *SpeI*, *PstI*, *Sall* (10 U/µl) respectivamente.

Las digestiones se llevaron a cabo por aproximadamente 2 h en un baño de agua a 37°C, el control fue DNA plasmídico sin digerir. A los DNAs digeridos y a los controles se les agregó buffer carga 6X y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % usando buffer TAE 1X.

Secuenciación y Análisis de Secuencia

El DNA plasmídico que se obtuvo por el método rápido se sometió a secuenciación en un secuenciador automático ALF Express II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), utilizando el método de terminación de cadena con dideoxidos (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977) y marcaje fluorescente con Cy5 usando el Kit Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para ello, se preparó una mezcla de dNTP/Cy5 ddNTP para cada uno de los cuatro nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina) añadiendo los siguientes componentes de forma separada para cada nucleótido 0.4 µl de dNTP 1.1 mM, 0.2 µl de dideoxidos marcados fluorescentemente (Cy5 ddNTPs: ddATP 8.8 µM, ddCTP 7.0 µM, ddGTP 17.6

μM , ddTTP 114.3 μM) y 1.6 μl de agua destilada estéril por cada reacción de secuenciación, que corresponde a cada uno de los nucleótidos. Se mezcló ligeramente y se centrifugó brevemente.

Para cada grupo de 4 reacciones (A, C, G, T) se preparó la siguiente mezcla 1.0-20.5 μl de DNA molde (se recomienda de 1 a 2 μg de plásmido), 2 μl de oligonucleótido T7 (4 pmol), 3.5 μl de buffer de reacción (Tris-HCl 150 mM, pH 9.5, MgCl_2 35 mM), 1 μl de DNA polimerasa Thermo Sequenase 10 U/ μl (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), agua destilada estéril hasta un volumen final de reacción igual a 27 μl , se mezcló ligeramente y se centrifugó de manera breve. Se tomaron 4 alícuotas de 6 μl y cada alícuota se añadió a las mezclas hechas de cada uno de los dNTP/Cy5 ddNTP (A, C, G, T).

Esta mezcla se colocó en un termociclador (PTC-200 DNA Engine, MJ Research, MA, USA) corriendo 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y 20 segundos. Al final del programa las muestras se mantuvieron a 4°C. Para la eliminación de oligonucleótidos y nucleótidos residuales se utilizaron columnas AutoSeq G-50 de Amersham Pharmacia Biotech, (Uppsala, Sweden) que contienen Sephadex G-50. Para esto se agregó 17 μl de agua destilada estéril a cada una de las reacciones para tener un volumen igual a 25 μl , se colocaron en las columnas y se centrifugó 1 minuto a temperatura ambiente a 2000 x g, la muestra purificada se recolectó en un tubo de soporte.

Después de la purificación se agregaron 8 μl de solución stop (formamida deionizada 100% y Dextran Blue 2000 (5 mg/ml) a cada reacción. El volumen se redujo a 4-8 μl secando parcialmente en un SpeedVac. Se calentó a 72°C por 3 minutos, se colocaron en hielo y se cargaron en un gel de secuenciación Repro gel long read (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) de 7% de poliacrilamida (p/v) y buffer TBE 1.5X (5X: 54 g de Trizma base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.5 M, pH 8), conteniendo agente desnaturizante y agente entrecruzante que polimeriza a la exposición a luz UV (Patente No SE 9604730-3).

Los parámetros de corrida de la electroforesis fueron 1500 V, 60 mA, 25 W, 55°C y 750 minutos como tiempo de corrida. Por otro lado, aproximadamente 1 µg (0.2 µg/µl) de DNA plasmídico extraído con fenol-cloroformo, se envió a secuenciar con los oligonucleótidos M13F (sentido) y M13R (antisentido) al Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (LMSE) de la Universidad de Arizona. El secuenciador automático utilizado fue un 2 ABI 337.

Las secuencias nucleotídicas se compararon y alinearon contra las secuencias depositadas en base de datos de banco de genes, usando las facilidades de internet del NCBI (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) y el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1990) usando la opción BLASTX, la cual hace una traducción a secuencias aminoacídicas en los 6 marcos de lectura (tres marcos directos y tres marcos de las secuencias complementarias).

Diseño de Oligonucleótidos Específicos de Catalasa de *P. vannamei*

Dos de los clones obtenido, llamados originalmente 7 y 13, correspondieron al cDNA parcial de catalasa en base a la similitud de secuencia aminoacídica de catalasa y se describen en resultados. Tomando como base esta secuencia se diseñaron primers específicos para su uso posterior y que fueron evaluados usando el programa de Oligo Calculator de Genosys (http://www.genosys.com/cgi-win/oligo_calonly.exe). Los parámetros evaluados fueron longitud, temperatura de alineación, no formación de estructura secundaria, porcentaje de GC y no formación de primers-dimers, así como que no alineara contra el vector en el que se encuentra el fragmento del gen de catalasa en cuestión, ni con la secuencia parcial del clon de catalasa en más de un sitio. Al oligonucleótido sentido se le dio el nombre de CatnFw mientras que al antisentido se le denominó CatnRv.

Secuenciación y Análisis de Secuencia del Clon 13 (pPVCAT-1)

Dado que la secuencia obtenida de los clones 7 y 13 fue parcial, se determinó la secuencia completa del clon 13, denominado pPVCAT-1 y que contiene el fragmento de 0.9 Kb del gen de catalasa de *P. vannamei* antes mencionado. La secuenciación se realizó utilizando el par de oligonucleótidos CatnFw y CatnRv, y previamente se amplificó el fragmento de PCR producido con estos primers que tiene una longitud de 660 pb utilizando las condiciones de componentes en la reacción previamente mencionadas y en donde se incluyeron los primers CatnFw y CatnRv y 2 μ l de *KTaq* recombinante producida en el Laboratorio de Biotecnología Marina en una reacción de 50 μ l. La solución se mezcló y se colocó en el termociclador. Las condiciones de corrida fueron: 1 ciclo de 94°C 3 minutos, 55°C 1 minuto, 72°C 3 minutos; 34 ciclos de 94°C 1 minuto, 60°C 1 minuto, 72°C 3 minutos y 10 minutos a 72°C y 4°C hasta su uso. Estas condiciones de corrida se denominará de aquí en adelante como programa 2. El fragmento de 660 pb se cortó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, la banda se cortó y se purificó por columna, (QIAGEN, QIAquick Gel Extraction Protocol, CA, USA) de acuerdo al siguiente protocolo.

Se agregaron 3 volúmenes de buffer QG con respecto al peso de la banda (100 mg \approx 100 μ l), se incubó por 10 minutos a 50 °C en baño de agua y una vez disuelta la agarosa, la muestra se agregó a la columna y se centrifugó por 1 minuto, recolectando el líquido en un tubo de soporte y se descartó el líquido. A la columna se le agregó 0.5 ml de buffer QG y se centrifugó por 1 minuto a 12000 x g, descartando el líquido del tubo de soporte, se agregó 0.75 ml de buffer PE a la columna y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 12000 x g, se descartó el líquido del tubo de soporte y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 12000 x g. La columna se puso en un micro tubo nuevo de 1.5 ml y se le agregó 30 μ l de buffer de elusión (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5), se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y después se centrifugó por 1 minuto a 12000 x g.

La concentración del fragmento purificado se determinó por comparación con estándares de concentración conocida separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, (Low Mass DNA Ladder, 100, 60, 40, 20 y 10 ng/2 μ l,

GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA). La muestra se secuenció en el Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (LMSE) de la Universidad de Arizona.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fue de nuevo incompleta, por lo que se diseñaron dos primers mas en base a las secuencias obtenidas y que fueron denominados *Catn2Fw* y *Catn2Rv*. Los parámetros de diseño que se consideraron fueron los mismos que se utilizaron para el diseño de *CatnFw* y *CatnRv*.

Generación de Sondas Homólogas Marcadas por PCR

El marcaje de DNA se hizo por PCR utilizando dos métodos, uno de ellos fue por incorporación de nucleótidos marcados con el esteroide digoxigenina, y el otro fue por incorporación de nucleótidos marcados radioactivamente con [³²P]dCTP. Estas dos sondas se utilizaron para hybridizar con DNA blanco de catalasa proveniente del banco de genes de hepatopáncreas.

Sonda Marcada con Digoxigenina

Para el marcaje de DNA con digoxigenina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) se utilizó 120 ng del clon de 0.9 Kb pPVCat-1, 10 µl de buffer 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 15 µl de MgCl₂ 25 mM, 3.3 µl de dig11-dUTP 1 nM, 1.67 µl de dTTP 10 mM, 2 µl de dNTPs 10 mM cada uno (A,C y G), 2.5 µl de *CatnFw* 20 µM, 7.5 de *CatnRv* 6.6 µM, 4 ul de *KTaq* y 48 µl de agua grado milli Q para un volumen final de 100 µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador bajo las condiciones de corrida del programa 2. Como control negativo se preparó una reacción igual a la anterior exceptuando el DNA.

El fragmento se purificó cortando la banda de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se agregó 3 volúmenes de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y 4 volúmenes de fenol, se agitó vigorosamente por 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 15800 x g, se recuperó la fase acuosa y se hizo una segunda extracción agregando un volumen de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8), se precipitó con etanol absoluto y se resuspendió en 100 µl de agua estéril (Ausubel *et al.*, 1995).

La sonda marcada se cuantificó por comparación con DNA control marcado con digoxigenina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) e inmovilizado en membrana de nylon (GeneScreen, Biotechnology Systems, NEN Research Products, MA, USA) y con concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 pg/µl y diluciones seriadas del DNA a cuantificar 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

Para la detección, la membrana se lavó en 5 ml de buffer de lavado (ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5, Tween 20 0.3 %) por 5 minutos, se incubó por 30 minutos en 3 ml de solución de bloqueo 1X (aparentemente leche en polvo), se incubó por 30 minutos con el anticuerpo anti-DIG-fosfatasa alcalina conjugada (anti-DIG-AP), (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 150 mU/ml (dilución 1:5000 en solución de bloqueo 1X), se lavó dos veces por 15 minutos con 20 ml de buffer de lavado, se equilibró por 5 minutos en 3 ml de buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM), se incubó con el sustrato (NBT/BCIP 10X, 200 µl por cada 10 ml de buffer de detección) hasta ver la coloración deseada. Estas soluciones son componentes del sistema de marcaje y detección no radioactivo DIG-DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA).

Sonda Marcada con [³²P] dCTP

Para el marcaje de DNA con [³²P] dCTP (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) se utilizaron 5 µl de buffer 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 7.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM cada uno (dATP, dGTP y dTTP), 0.2 µl de

dCTP 10 mM, 5 μ l de [α^{32} P]dCTP 10 μ Ci/ μ l, 5 μ l del oligonucleótido T7 20 μ M, y 5 μ l del oligonucleótido M13R 20 μ M, 10 ng de DNA del clon de 0.9 Kb pPVCat-1, 2 μ l de *K-Taq* y 18.8 μ l de agua grado milli Q para un volumen final de 50 μ l. La mezcla se colocó en un termociclador bajo las condiciones de corrida del programa 2.

La sonda marcada radioactivamente se cuantificó usando 1 μ l de la reacción de marcaje aplicada a filtro de fibra de vidrio y se lavó 5 veces con ácido tricloroacético (TCA) 5 %, pirofosfato de sodio 0.5 % (Sambrook *et al.*, 1989). Al resto de la reacción se añadió 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó a -20° C por 30 minutos y se centrifugó a 13,200 x g por 30 minutos y el pellet se lavó con 100 μ l de etanol al 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 μ l de agua grado milli Q, se tomó 1 μ l y se aplicó al filtro de fibra de vidrio (Sambrook *et al.*, 1989). La radiactividad de la sonda se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman, CA, USA).

Aislamiento de Banco de Genes de cDNA de Hepatopáncreas

Los bancos de genes de DNA complementario (cDNA) representan la información expresada en el mRNA de un tejido u órgano particular. Las moléculas de RNA son extremadamente lábiles, por esta razón, la información codificada en el mRNA se convierte en una cadena doble de DNA estable (cDNA) y luego se inserta en un vector. El banco de cDNA fue construido en el sistema ZAP Express (Stragene, La Jolla, CA, USA). Una vez que la información está disponible en la forma de banco de genes de cDNA, se pueden aislar segmentos individuales procesados de la información genética original. Para el aislamiento de clones potenciales se realizó cribado primario, secundario y terciario como se describe a continuación.

Preparación de la Bacteria Huésped e Infección

El cribado primario se inició sembrando la bacteria XL1 Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA, USA) en placas de LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-tetraciclina (12.5 $\mu\text{g/ml}$), a partir de un stock de glicerol y se incubó a 37°C, 200 rpm toda la noche, luego se inoculó una colonia en 10 ml de medio NZY (0.5 % de NaCl, 0.2 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 % de extracto de levadura, 1.0 % de NZ amina, pH 7.5), suplementado con MgSO_4 10 mM y maltosa al 0.2%. Se incubó a 37°C agitando a 200 rpm toda la noche y se centrifugó a 500 x g por 10 minutos y el sobrenadante se descartó. Las células se resuspendieron en 5 ml de MgSO_4 10 mM y se diluyó con MgSO_4 10 mM hasta tener una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm.

La infección de las bacterias XL1 Blue MRF' se realizó con aproximadamente 350,000 pfu, añadiendo aproximadamente 50,000 pfu a 600 μl de células bacterianas preparadas ($A_{600} = 0.5$) y se incubó a 37°C por 15 minutos. A la mezcla de bacterias más fagos se añadió 6.5 ml de medio Top-agar (caldo NZY, 0.7% de agarosa) mantenido a 55°C en baño de agua. Esta mezcla se vació sobre medio NZY-agar (caldo NZY, agar 1.5 %) solidificado previamente en cajas petri de 150 mm y se incubó aproximadamente 8 h a 42°C en incubadora.

Una vez que se observaron zonas de lisis, las cajas petri se enfriaron a 4°C por aproximadamente 2 h. Para hacer réplicas de trabajo del DNA en membrana, se colocó una membrana de nylon Hybond (Pharmacia, Suecia) sobre el medio sólido de las cajas petri por 15 minutos para permitir la transferencia de las partículas de los fagos hacia las membranas y éstas se marcaron con tinta china utilizando una aguja para no perder la orientación de las membranas sobre la placa de cultivo.

Réplica de DNA en Membrana e Hibridación con Sonda

Las membranas se separaron del medio sólido para prepararlas para hybridizar con la sonda; 1 de las 7 membranas se hibridizó con la sonda radioactiva, mientras que el resto se hibridizaron con la sonda marcada con digoxigenina. Las membranas se

sometieron a desnaturalización del DNA sumergiéndolas por 2 minutos en una solución de NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M y se neutralizaron sumergiéndolas por 5 minutos en una solución de NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, pH 8, y se lavaron por 30 segundos en una solución de Tris-HCl 0.2, M pH 7.5, buffer SSC 2X (1.753 % de NaCl, 0.882 % de citrato de sodio, pH 7). El exceso de humedad se eliminó poniendo las membranas sobre papel filtro. El DNA se entrecruzó a las membranas usando el programa C3 (150 mJoules) de un Crosslinker (GS Gen Linker, Bio Rad, CA, USA).

Para la hibridación con la sonda radioactiva se utilizó 31 ml de solución de hibridización (SSC 6X, formamida deionizada 50%, solución Denhardt's 5X, SDS 0.5%, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml). La membrana se prehibridizó por 1.5 h a 42°C, luego se agregó la sonda para tener 5.4×10^4 cpm/ml, previamente desnaturalizada a 100 °C por 10 minutos). Se incubó por 40 h a 42 °C en un baño de agua con agitación y se lavó dos veces por 15 minutos a temperatura ambiente con una solución 2X SSC, 0.1 % SDS, luego se lavó dos veces por 15 minutos a 60°C con una solución 2X SSC, 0.1 % SDS, después se lavó una vez por 30 minutos a 60°C con una solución 0.1X SSC, 0.5% SDS. Como control positivo se usó 10 ng del clon pPVCat-1.

Las seis membranas restantes se hibridizaron con la sonda marcada con digoxigenina, y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA). Para ello se incubaron 1 h a 68°C con 100 ml de solución estándar de prehibridización (SSC 5X, N-laurilsarcosina 0.1 %, SDS 0.02 %, reactivo de bloqueo –aparentemente leche en polvo-1%), se retiró la solución y se agregó 20 ml de la misma solución y 15 ng/ml de sonda y se incubó por 16 h a 68°C. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces por 5 minutos cada vez a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X, SDS 0.1 % y dos veces por 15 minutos en una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1 %, cada vez a 68°C.

Detección de Clones Potenciales en Película de Rayos X

La detección de clones potenciales, cuando se utilizó la sonda marcada con digoxigenina se llevó a cabo como anteriormente se describió para la cuantificación de la sonda marcada con digoxigenina excepto en lo siguiente: se incubó por 3 h con 100 ml de solución de bloqueo 1X y 1 h con el anticuerpo antidigoxigenina (anti-DIG-AP) diluido 1:5000 (20 µl de anticuerpo en 100 ml de solución de bloqueo) y después con el sustrato quimioluminiscente Lumiphos 530 (USB, Amersham Life Science, Cleveland, Ohio, USA) 0.01 ml/cm². Cada membrana se colocó individualmente en bolsa de plástico.

Como control positivo se usó 10 ng del clon parcial de catalasa de *P. vannamei* pPVCat-1 y como control negativo se usó 10 ng de un clon de lisozima de *Manduca sexta*. Una vez puesto el sustrato, se incubó por 20 minutos en oscuridad en cassettes herméticamente sellados (Cronex Lightning Plus T, Dupont, USA) y luego se cubrió con película de rayos X Biomax (Sigma Chemical, CO, St Louis MO, USA) y se reveló por 2 minutos en solución reveladora (Eastman Kodak, CO, Rochester, NY, USA), se lavó por 2 minutos con agua destilada, se colocó en solución fijadora (Eastman Kodak, CO, Rochester, NY, USA) por 2 minutos y finalmente se lavó por 5 minutos con agua destilada y se dejó secar al aire. Para la detección de clones potenciales cuando se usó la sonda radioactiva, las membranas se cubrieron con película de rayos X Biomax y se expusieron toda la noche a -80°C y luego se dejaron 1.5 h a temperatura ambiente y se procedió con la detección por revelado, lavado, fijación y lavado como se describió anteriormente.

Para el cribado secundario, las muestras que se utilizaron para infectar las bacterias XL1 Blue MRF⁺ fueron los fagos contenidos en las zonas de lisis potenciales positivas del cribado primario. Se extrajo el medio sólido correspondiente a estas zonas y los fagos se eluyeron en 500 µl de buffer SM (NaCl 0.58%, MgSO₄·7H₂O 0.2 %, 50 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.5, 5 ml de gelatina 2 % y agua hasta un volumen de 1 litro) y 20 µl de cloroformo y se mezcló en un vórtex, dejando los tubos en incubación a temperatura ambiente por aproximadamente 2 h. Para el cribado terciario se eluyeron los fagos de las zonas potenciales positivas del aislamiento

secundario de la forma ya descrita y con éstos se infectaron las bacterias XL1 Blue MRF'. Se hizo réplica en membrana, se hibridizó con la sonda marcada con digoxigenina y se detectó de la manera descrita para el aislamiento primario cuando se usó la sonda no radioactiva.

Después de la selección de cada clon potencial se realizó cribado por PCR para confirmación, usando como DNA molde los fagos eluidos de las zonas potenciales positivas y se amplificó utilizando los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv. Las condiciones de corrida fueron las del programa 2. El análisis electroforético se hizo en gel de agarosa al 1%, el gel se tiñó y se fotografió de la manera descrita anteriormente.

In Vivo Excision

El plásmido recombinante producto de la excisión in vivo en el sistema ZAP Express tiene como base el vector pBK-CMV (Stratagene, La Jolla CA.) Estos plásmidos recombinantes se usan para transformar *E. coli* que se siembran en medio selectivo para formar colonias. El DNA plasmídico se puede usar para análisis del inserto por digestión con enzimas de restricción y para secuenciación.

Los fagos eluidos de las zonas de lisis potenciales positivas se utilizaron para transformar bacterias, para ello se cultivaron células XL1Blue MRF' en caldo NZY suplementado con maltosa al 0.2 % y MgSO₄ 10 mM. Así mismo, se cultivaron células XLOLR en caldo NZY a 30°C toda la noche a 200 rpm. Estos cultivos se centrifugaron a 1000 x g, el pellet se resuspendió en MgSO₄ 10 mM y la densidad óptica se ajustó a 1.0 con este último reactivo. En un tubo falcon 2059 se hizo la siguiente mezcla: 200 µl de XL1Blue MRF' de densidad óptica 1.0, 250 µl de un stock de fago y 1 µl de ExAssist helper phage (> 1X10⁶

pfu/ μ l) (Stratagene, La Jolla, CA, USA), se incubó por 15 minutos a 37°C; se agregó 3 ml de caldo NZY y se incubó por 3 h a 37°C con agitación, se calentó a 65-70°C por 20 minutos y se centrifugó a 1000 x g por 15 minutos.

El sobrenadante conteniendo al fagémido pBK-CMV se puso en un tubo falcon 2059 estéril, luego se agregó 200 μ l de células XLOLR de densidad óptica 1.0 a 2 tubos falcon 2059 y 100 y 10 μ l del sobrenadante que contiene el fagémido a cada tubo respectivamente. Esta mezcla se incubó por 15 minutos a 37°C, se le agregó 300 μ l de caldo NZY, se incubó a 37°C por 45 minutos, se colocó 200 μ l de esta mezcla en cajas petri conteniendo medio LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-kanamicina (50 μ g/ml) y se incubó a 37°C toda la noche. De esta manera, las colonias que aparecen en las cajas petri contienen el plásmido de doble cadena con inserto de DNA clonado. Después se procedió con el aislamiento de DNA plasmídico y la secuenciación, para análisis de fragmento clonado, de la manera descrita anteriormente.

Aislamiento de RNA total para RACE, Northern y RT-PCR

Para la extracción de RNA total se utilizó TRIZOL (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Los tejidos usados fueron 0.24 g de branquias, 1.13 g de hepatopáncreas y 1.15 g de músculo, a los cuales se les agregó 1.5 ml del TRIZOL y se homogenizaron en un polytron PT-MR 2100 (kinemática AG, Switzerland). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregó 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico por cada ml de homogenizado, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos; se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 x g por 15 minutos a 4°C.

Con la centrifugación se separaron una fase acuosa superior, una interfase y una fase inferior rojiza. La fase acuosa superior se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y el RNA se precipitó agregando a cada muestra 500 μ l de isopropanol, mezclando por inversión e incubando las muestras a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 x g a 4°C por 15 minutos y el precipitado se secó en un SpeedVac. Las muestras se lavaron dos veces adicionando 200 μ l de etanol al 75 % preparado con agua tratada con dietilpírocarbonato al 0.1% (agua-DEPC) y centrifugando 3 minutos a 15,700 x g a 4°C cada vez.

El precipitado se secó en un SpeedVac y se resuspendió en 400, 600 y 400 μ l de agua tratada con DEPC 0.01 %, respectivamente, para el RNA procedente de branquias, hepatopáncreas y músculo. El volumen de 600 μ l correspondiente al RNA de hepatopáncreas se dividió en tres alícuotas de 200 μ l. A cada una de las muestras de RNA se les determinó concentración por absorbancia a una $\lambda=260$ nm.

La integridad del RNA se confirmó por electroforesis en gel al 1% de agarosa-formaldehído, preparado con buffer MOPS 1X (MOPS 0.02 M, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7), libre de RNasas. Antes de que la agarosa polimerizara (aproximadamente 55°C) se le agregó formaldehído al 37 %, para tener concentración final 2 M, como una modificación de la técnica de Yepiz-Plascencia (2000) y se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente antes de su uso. Para la preparación de la muestra se calculó el volumen necesario de RNA, proveniente de los tejidos hepatopáncreas, branquias y músculo para cargar 30 μ g en el gel.

A las muestras se les agregó un volumen igual de buffer muestra (0.75 ml de formamida desionizada, 0.15 ml de MOPS 10X, 0.24 ml de formaldehído, 0.1 ml de agua tratada con DEPC, 0.1 ml de glicerol, 0.08 ml de azul de bromofenol al 10%) y se calentó a 75°C en baño de agua por 20 minutos, se colocó en hielo y se le agregó 0.5 μ l de bromuro de etidio 1 mg/ml. La electroforesis se llevó a cabo en buffer cámara con MOPS 1X y aplicando 50 volts. La electroforesis se corrió hasta ver la migración del azul de bromofenol aproximadamente $\frac{3}{4}$ del gel y se tomó la fotografía como anteriormente se describió.

Detección del mRNA de catalasa

Para la detección del mRNA de catalasa en el RNA de hepatopáncreas se usó transcripción reversa y reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR). Para la transcripción reversa (síntesis de cDNA) se mezclaron 1.06 μ l de RNA total (3.76 μ g/ μ l), 2 μ l de oligo-dT 1 μ M y 20.9 μ l de agua tratada con DEPC y se incubó por 10 minutos a 70 °C y luego en hielo por 2 minutos. Después se agregó 2 μ l de SuperScript II 200 U/ μ l (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), 8 μ l de buffer de primera cadena 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 4 μ l de DTT 0.1 M, 2 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, se incubó por 50 minutos a 42°C y 10 minutos a 75°C. Enseguida se agregó 2 μ l de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó por 20 minutos a 37°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando cDNA equivalente a 32 ng de mRNA estimado en base a la relación de 75 μ g de RNA total contienen 3.75 μ g de mRNA o 5% del RNA total (Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega). La mezcla contenía 5 μ l de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 7.5 μ l de MgCl₂ 25 mM, mezcla de dNTP's 0.25 mM cada uno, 3 μ l de oligonucleótido CatnFw 20 μ M, 4 μ l de oligonucleótido CatnRv 6.6 μ M, 2 μ l de K-Taq polimerasa y 22.5 μ l de H₂O estéril. Se realizó una segunda amplificación con 96 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero. Las condiciones de corrida fueron las del programa 2.

Amplificación Rápida de Extremos de cDNA

Para este experimento se utilizó el sistema RACE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) con RNA total de hepatopáncreas que se sometió a defosforilación, remoción de la estructura del Cap de los RNA mensajeros completos, la ligación de un oligonucleótido de RNA en el extremo 5' y posteriormente la obtención de cDNA por transcripción reversa. Se incluyeron también los RNA control incluidos recomendados por el fabricante.

Defosforilación

La defosforilación se llevó a cabo mezclando 5 µg de RNA total de hepatopáncreas, 1 µl de buffer CIP 10 X (Tris-HCl 5 mM, pH 8.5, EDTA 1 mM), 1 µl de inhibidor de RNasa (10 U/µl en HEPES-KOH 20 mM, pH 7.6, KCl 50 mM, DTT 5 mM, glicerol 50%), 1 µl de CIP (Calf Intestinal Phosphatase, 10 U/µl en Tris-HCl 25 mM, pH 7.6, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, glicerol 50%) y 2 µl con agua tratada con DEPC. Para el control se utilizó 1 µg de RNA total HeLa y el volumen de reacción se ajustó a 10 µl con agua tratada con DEPC. La mezcla se agitó suavemente con pipeta y con vórtex y se centrifugó a 13200 x g. Se incubó por 1 h a 50 °C, se centrifugó brevemente y se colocó en hielo.

Al RNA tratado se agregó 90 µl de agua tratada con DEPC y 100 µl de fenol:cloroformo (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, 25:24:1; 8-hidroxiquinoleína 0,1%) y se mezcló vigorosamente por 30 segundos en vórtex y se centrifugó a 13200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa superior se transfirió a un microtubo nuevo y se añadió 2 µl de glucógeno (10 mg/ml), 10 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, se mezcló y se agregó 220 µl de etanol al 95%, se mezcló de nuevo en vórtex brevemente y se incubó a -20°C toda la noche. Después se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 13200 x g. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 75% invirtiendo varias veces y agitando brevemente. Después se centrifugó a 4°C por 2 minutos, se retiró el etanol y se repitió el lavado. El pellet se secó por 2 minutos a temperatura ambiente y 2 minutos en SpeedVac y posteriormente se resuspendió en 7 µl de agua tratada con DEPC para proceder a la remoción de la estructura del Cap.

Remoción de la Estructura del Cap de los RNA Mensajeros

Después de la defosforilación y precipitación del RNA, se le realizó la remoción de la estructura del Cap de los RNA mensajeros a 4°C en baño de agua-hielo. Se utilizaron los 7 µl de RNA defosforilado, 1 µl de buffer TAP 10X (acetato de sodio

0.5 M, pH 6, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 1%, Triton X-100 0.1%), 1 μ l de inhibidor de RNasa, 1 μ l de TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase 0.5 U/ μ l en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 0.1 M, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.01%, glicerol 50%), teniéndose un volumen final de reacción de 10 μ l.

Esta mezcla se agitó suavemente con pipeta y vórtex, se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos y se incubó a 37°C por 1 h, después se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos y se colocó en hielo. Seguidamente se procedió a precipitar el RNA de la forma descrita anteriormente, a excepción del tiempo de secado del pellet de RNA, el cual se redujo a 2 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 6 μ l de agua tratada con DEPC y se realizó la ligación de un oligonucleótido de RNA a los RNAs a los cuales se les removió la estructura del Cap en el extremo 5' del mensaje.

Ligación del Oligonucleótido de RNA

A 0.25 μ g de oligonucleótido de RNA Gene Racer liofilizado (5'CGACUGGAGCA CGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA3'), se le agregó los 6 μ l de RNA a los cuales se les hizo remoción de la estructura del Cap, el oligo de RNA se resuspendió y se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos para coleccionar el contenido en el fondo del tubo. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos para relajar la estructura secundaria, se colocó en hielo por aproximadamente 2 minutos y se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos. Se mezcló buffer T4 RNA ligasa 10X (Tris-acetato 330 mM, pH 7.8, acetato de potasio 660 mM, acetato de magnesio 100 mM, DTT 5 mM), 1 μ l de inhibidor de RNasa (10 U/ μ l), 1 μ l de T4 RNA ligasa (5 U/ μ l en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.1M, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.1%, glicerol 50%), teniéndose un volumen final de reacción de 10 μ l. La mezcla se incubó 1 h a 37°C, se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos, se colocó en hielo, se procedió con la precipitación del RNA de la manera ya descrita anteriormente, el pellet se resuspendió en 12 μ l de agua tratada con DEPC y se procedió con la transcripción reversa.

Transcripción Reversa

A los 12 μl de RNA al cual se le ligó el oligonucleótido de RNA se le agregó 1 μl de oligo dT (GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈) 400 ng/ μl y 1 μl de hexámeros arbitrarios (random hexamers) 100 ng/ μl , se incubó a 70°C por 5 minutos y se colocó en hielo por 2 minutos, se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos y se agregaron los siguientes componentes: 1 μl de mezcla de dNTPs (25 mM cada uno), 2 μl de buffer RT 10X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, MgCl₂ 50 mM, KCl 500 mM, DTT 20 mM), 1 μl de AMV-RT (Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, 5 U/ μl en fosfato de potasio 200 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 0.2 %, glicerol 50 %), 1 μl de inhibidor de RNasa (10 U/ μl), teniéndose un volumen final de reacción de 20 μl . Se incubó a 42°C por 1 h y después a 85°C por 15 minutos, se centrifugó a 13200 x g por 5 segundos y se guardó a -20°C hasta su uso para amplificar fragmentos de DNA.

Amplificación de Extremos de cDNA y Reamplificación de Fragmentos de DNA por Nested PCR

El cDNA obtenido por transcripción reversa se diluyó dos veces, tanto el obtenido a partir del RNA de hepatopáncreas como el del control, teniendo con esto un volumen de 40 μl para cada uno. Este cDNA proviene de 5 μg de RNA total, correspondiendo a una concentración de 125 ng/ μl del RNA total original. Para amplificar el fragmento de DNA correspondiente al extremo 5' del gen que codifica la enzima catalasa de *P.vannamei* se utilizó: 1 μl de oligonucleótido GeneRacer 5' (5'CGACTGGAGCAC GAGGACACTGA3') 10 μM , 4 μl de oligonucleótido CatnRv 6.6 μM , 10 μl de cDNA diluido de hepatopáncreas, 10 μl de buffer de PCR 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, (NH₄)₂SO₄ 75 mM, MgCl₂ 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 4 μl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 1 μl de DNA polimerasa Thermozyne 1 U/ μl (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y 20 μl de agua estéril, para tener un volumen final de reacción de 50 μl .

Para amplificar el fragmento de DNA correspondiente al extremo 3' del gen que codifica la enzima catalasa de *P. vannamei* se realizó una reacción de PCR igual a la anterior, a excepción del par de oligonucleótidos, siendo 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 3' (5'GCTGTCCAACGATACGCTACGTAACG3') 10 µM y 3 µl del oligonucleótido específico CatnFw 20 µM el par que se utilizó y 21 µl de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 50 µl. Las condiciones de corrida fueron las del programa 2.

Como control se hizo una amplificación de los extremos 5' y 3' del gen de la β-actina de células HeLa. La amplificación del extremo 5' tuvo los mismos componentes anteriores a excepción del par de oligonucleótidos y el DNA utilizado como molde, siendo éstos 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 5', 1 µl del oligonucleótido control B.1 (5'GACCTGGCCGTCAGGCAGCTCG3') 10 µM, 4 µl del cDNA diluido y 32 µl de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 50 µl. Para la amplificación del fragmento del extremo 3' del gen de la β-actina se usaron también las mismas condiciones que para el extremo 5' del mismo gen, a excepción del par de oligonucleótidos y la cantidad del DNA molde, siendo éstos 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 3', 1 µl del oligonucleótido control A (5'GCTCACCATGGATGATGA TATCGC3') 10 µM, 1 µl del cDNA diluido y 28 µl de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 50 µl.

Las condiciones de corrida fueron 94°C por 2 minutos; 5 ciclos de 94 °C por 30 segundos y 72 C por 1 minuto; 5 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 70 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto; 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos; 4 °C hasta su uso. A estas condiciones de corrida se le denominará de aquí en adelante como programa 3. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agrosa al 1.2 % en donde se analizaron 10 µl de cada reacción y se incluyó el estándar de DNA 1 Kb ladder. El gel se tiñó y fotografió bajo luz UV como anteriormente se describió.

Para obtener el extremo 5' de catalasa fue necesaria una reacción de PCR anidada (Nestd PCR), la cual se realizó usando 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 5'Nested (5'GGACACTGACA TGGACTGAAGGAGTA3') 10 µM, 4 µl del oligonucleótido CatnRv 6.6 µM, 1 µl de la reacción de PCR inicial, 10 µl del buffer de PCR 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, (NH₄)₂SO₄ 75 mM, MgCl₂ 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 4 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 1 µl de DNA polimerasa Thermozyyme 1 U/µl y 29 µl de agua estéril para un volumen final de reacción de 50 µl. Para la PCR anidada del extremo 3' de catalasa se utilizó 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 3' Nested (5'CGCTACGTAACGGCATGACAGTG3') 10 µM, 3 µl del oligonucleótido CatnFw 20 µM, 1 µl de la reacción de PCR inicial (05), 10 µl del buffer de PCR 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, (NH₄)₂SO₄ 75 mM, MgCl₂ 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 4 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 1 µl de DNA polimerasa Thermozyyme 1 U/µl y 30 µl de agua estéril para un volumen final de reacción de 50 µl. Las condiciones de corrida fueron las del programa 3.

Se realizó una segunda reacción de amplificación del extremo 5' del gen de catalasa del camarón blanco *P. vannamei*, para ello se llevó a cabo una nueva obtención de cDNA (Set II) a partir de 5 µg de RNA total de hepatopáncreas, al que se le dio el mismo tratamiento ya descrito, el cual consistió en una defosforilación, remoción de la estructura del Cap de los mensajes completos, la ligación de un oligonucleótido de RNA (GeneRacer RNA oligo) a los mensajes a los cuales se les hizo la remoción de la estructura del Cap y posteriormente la transcripción reversa. Este cDNA se precipitó utilizando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó a -80 °C por 30 minutos, se centrifugó por 30 minutos a 13200 x g a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con etanol al 70 % frío, centrifugando 5 minutos a 4°C cada vez, se secó en un SpeedVac por 10 minutos y se resuspendió en 80 µl de agua estéril.

Para esta amplificación se utilizó 1 µl del oligonucleótido GeneRacer 5', 4 µl del oligonucleótido CatnRv 6.6 µM, 2 µl del cDNA (equivalente a 125 ng del RNA total original), 4 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 10 µl del buffer de PCR 5X

(Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, MgCl_2 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 1 μl de la enzima Thermozyme 10 U/ μl y 28 μl de agua estéril para un volumen final de 50 μl . Las condiciones de amplificación fueron las del programa 3.

Para la reamplificación anidada del extremo 5' de catalasa, se utilizó 1 μl del oligonucleótido GeneRacer 5' Nested 10 μM , 4 μl del oligonucleótido CatnRv 6.6 μM , 1 μl de la reacción de PCR inicial diluida 1:10, 10 μl del buffer de PCR 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, MgCl_2 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 4 μl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 1 μl de DNA polimerasa Thermozyme 10 U/ μl y 29 μl de agua estéril para un volumen final de reacción de 50 μl .

Para amplificación del fragmento correspondiente al extremo 3' del cDNA de catalasa, se usaron los siguientes componentes: 4.5 μl de oligonucleótido CatnFw, 1.5 μl de oligonucleótido GeneRacer 3', 3 μl de cDNA (equivalente a 187 ng del RNA total original), 10 μl de buffer PCR 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, MgCl_2 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 6 μl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 1.5 μl de enzima Thermozyme 10U/ μl y 23.5 μl de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 50 μl . Las condiciones de corrida fueron las del programa 2. El fragmento de 1,4 Kb se purificó por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, en el cual se cargaron 35 μl y el gel se tiñó con bromuro de etidio y se tomó la fotografía de la manera ya descrita anteriormente.

La banda se cortó del gel con espátula estéril y se purificó por columnas QIAGEN, de la manera ya descrita anteriormente. El DNA contenido en el volumen de elusión se concentró hasta 5 μl y se usó para reamplificación como sigue: 4 μl del oligonucleótido CatnFw, 1 μl del oligonucleótido GeneRacer 3' Nested, 1 μl de DNA, 10 μl de buffer 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 8.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, MgCl_2 12.5 mM, Triton X-100 0.01 %), 1 μl de enzima Thermozyme 10 U/ μl , 4 μl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno y 29 μl de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 50 μl . Las condiciones de corrida fueron las del programa 2.

Obtención de Recombinantes RACE

La clonación del producto de PCR correspondiente al extremo 5' del gen de catalasa de *P. yannamei* obtenido por RACE se realizó de acuerdo a la técnica de AdvanTAGE PCR Cloning (Clontech, Palo Alto, CA). El fragmento purificado se sometió a tratamiento con Taq polimerasa para asegurar la adición de adenina terminal en el extremo 3' (refreshing), para ello se agregó 2 µl de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 1.6 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 12 µl de DNA, 1 µl de *K-Taq*, 0.4 µl de agua, para un volumen final de reacción de 20 µl, se incubó a 72 °C por 20 minutos. El DNA se precipitó con etanol y se resuspendió en 12 µl de agua estéril.

De estos 12 µl se tomó 2 para ligar al vector pT-Adv de acuerdo a la siguiente reacción: 1 µl de buffer de ligación 10X (Tris-HCl 60 mM, pH 7.5, MgCl₂ 60 mM, NaCl 50 mM, BSA 1 mg/ml, β-mercaptoetanol 70 mM, ATP 1 mM, ditioneitol 20 mM, spermidina 10 mM), 2 µl de producto de PCR, 2 µl de vector pT-Adv (25 ng/µl), 1 µl de T4 DNA ligasa (40 U/µl) y 4 µl de agua para tener un volumen final de reacción de 10 µl. Se incubó a 14°C toda la noche, se centrifugó brevemente y se colocó en hielo, se tomó 2 µl de esta reacción de ligación y se agregaron a 50 µl de células competentes *E. coli* TOP10F', las cuales se descongelaron previamente en hielo. La reacción de ligación más las células se incubaron en hielo por 30 minutos, se sometió a choque térmico por exactamente 30 segundos a 42 °C en baño de agua, sin mezclar ni agitar, después se colocó en hielo por 2 minutos y se agregó 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente, se incubó a 37 °C por 2 h a 225 rpm en un agitador.

Posteriormente se esparcieron 75 y 200 µl sobre la superficie de dos placas con medio LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-kanamicina 50 µg/ml-40 µl de IPTG 100 mM-40 µl de X-Gal 40 mg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C por aproximadamente 18 h hasta que las colonias fueron visibles.

Para la clonación del fragmento de 1.4 Kb se procedió con el aseguramiento de la adición de adenina terminal en el extremo 3', incorporando los siguientes componentes: 0.5 μ l de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 0.75 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DNA purificado, 0.5 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 0.5 μ l de DNA polimerasa *K-Taq* recombinante, 0.75 μ l de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 5 μ l y se incubó por 20 minutos a 72°C en baño de agua. La clonación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de pGEM-T Easy Vector System I, descrita anteriormente, se añadió 5 μ l de buffer de ligación 2X, 0.8 μ l de vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ l), 3.2 μ l de DNA, 1 μ l de T4 DNA ligasa (3 U/ μ l), teniéndose un volumen final de reacción de 10 μ l.

Después se procedió con la transformación de 50 μ l de células electrocompetentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando un electroporador (Gene Pulser II, Bio-Rad, CA, USA) usando 400 Ω , 25 μ F y 2.5 kV. Se añadió 250 μ l de medio SOC (SOB, glucosa 20 mM) y se incubó a 37°C por 1 h a 225 rpm en un agitador. Se esparcieron 50, 100 y 150 μ l en placas que contenían medio LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-ampicilina 100 μ g/ml y 40 μ l de IPTG 100 mM y 40 μ l de X-Gal 40 mg/ml. Las placas se incubaron a 37°C por aproximadamente 18 h hasta que las colonias fueron visibles.

Análisis de Recombinantes y Extracción de DNA Plasmídico

Para el análisis de clones potenciales positivos correspondientes al extremo 5' del gen se seleccionaron 6 colonias, 1 blanca y 5 azules, cada colonia fue picada con un palillo de madera estéril y se inoculó en 5 ml de caldo de cultivo LB (NaCl 1.0 %, triptona 1.0 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1.5 %, pH 7)-kanamicina 50 μ g/ml. Para el clon potencial positivo del extremo 3' correspondiente al fragmento de 1.4 Kb, se seleccionaron 6 colonias blancas y se inocularon en 5 ml de caldo de cultivo Terrific (Triptona 1.2 %, extracto de levadura 2.4 %, glicerol 0.4 %, KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM)-ampicilina 100 μ g/ml. A los cultivos líquidos se les dio el tratamiento para electroforesis de DNA superenrollado ya descrito anteriormente. De

los clones que resultaron potenciales positivos en el análisis anterior se hizo extracción de DNA plasmídico de la manera ya descrita anteriormente y los pellets se resuspendieron en 30 μ l de agua estéril.

Digestión de los Recombinantes RACE con *EcoRI*

La digestión del plásmido correspondiente al extremo 5' del gen se llevó a cabo utilizando 5 μ l del DNA del clon potencial positivo y se incubó con 0.5 μ l de la enzima *EcoRI* (10 U/ μ l), por 1.5 h a 37 °C en baño de agua, mientras que para la digestión del plásmido correspondiente al extremo 3' del gen, se utilizó DNA plasmídico de 6 clones potenciales que no habían sido extraídos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, a los cuales se les hizo tal purificación después de la digestión; para digerir se utilizó 3 μ l de DNA plasmídico y se incubó con 0.5 μ l de la enzima *EcoRI* (10 U/ μ l), por 1.5 h a 37°C en baño de agua.

Secuenciación y Análisis de Secuencia

Para la secuenciación de los plásmidos, se consideró aproximadamente 1 μ g (0.2 μ g/ μ l) del DNA extraído con fenol-cloroformo para cada muestra y se envió a secuenciar con los oligonucleótidos M13F (sentido) y M13 R (antisentido) al Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (LMSE) de la Universidad de Arizona, además, el clon correspondiente al extremo 5' del gen, también se secuenció con el oligonucleótido Catn2Rv y el del extremo 3' con el Catn2Fw. Las secuencias nucleotídicas se compararon y alinearon contra otras depositadas en base de datos de banco de genes, de la manera descrita anteriormente.

Determinación del Tamaño del Mensaje de Catalasa por medio de Northern blot

Para la determinación del tamaño del mensaje de catalasa se utilizaron 8 μ g de RNA mensajero extraídos a partir del RNA total proveniente del tejido hepatopáncreas.

Para la extracción del RNA mensajero se siguió el protocolo de Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (DynaL, Oslo Noruega). Los Dynabeads Oligo (dT) son esferas magnéticas que tienen unido covalentemente una cadena de 25 nucleótidos de deoxitimidinas, permitiéndose la unión entre éstos y la cadena poliadenilada de los mensajeros. Primeramente, los Dynabeads Oligo (dT) se acondicionaron resuspendiendo el stock y transfiriendo 250 µl a un microtubo de 1.5 ml libre de RNAsas que se colocó en un magneto (DynaL MPC®) y se removió el sobrenadante después de 30 segundos. El tubo se retiró del magneto y los Dynabeads Oligo (dT) se resuspendieron en 100 µl de buffer de unión 2X (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, LiCl 1.0 M, EDTA 2 mM), se mezcló en vórtex, se colocó en el magneto, se retiró el sobrenadante, se repitió el lavado y se resuspendió en 100 µl de buffer de unión 2X (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, LiCl 1.0 M, EDTA 2 mM).

La muestra de RNA total (112.8 µg, 3.76 µg/µl) se ajustó a un volumen de 100 µl y se calentó a 65°C por 2 minutos en baño de agua, después se puso en contacto con los Dynabeads Oligo (dT) resuspendidos en el buffer de unión y se mezcló por 5 minutos en vórtex cada minuto. Después se colocó en el magneto y se retiró el sobrenadante, el complejo Dynabeads Oligo (dT)-RNA mensajeros se lavó 2 veces con 200 µl de buffer de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, LiCl 0.15 M, EDTA 1 mM). La elusión se hizo en 20 µl de agua tratada con DEPC, calentando por 2 minutos a 65°C en baño de agua. La extracción se repitió 4 veces más y los volúmenes de elución se juntaron y se concentró a 11 µl en un SpeedVac.

Para evaluar la concentración del RNA mensajero, se tomó 1 µl y se hicieron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000 y se comparó visualmente contra concentraciones conocidas de estándar de RNA (0.24-9.5 Kb, Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 800, 600, 400, 200, 100, 50 y 10 ng/µl, por medio de la técnica de cuantificación por ensayo en placa con bromuro de etidio (Yepiz-Plascencia, 2000).

Inmovilización de RNA Mensajero en Membrana

El RNA mensajero se separó por electroforesis en gel de azarosa-formaldehído como anteriormente se describió y el RNA se transfirió a membrana Hybond de acuerdo al protocolo de VacuGene XL (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Para ello, se recortó una membrana de nylon, del mismo tamaño del gel y se sumergió por 20 minutos en solución 20X SSC (NaCl 17.5%, citrato de sodio 8.82 %, pH 7).

La membrana se colocó en la cámara de transferencia y el gel se colocó sobre la membrana, inmediatamente después se agregó sobre la superficie del gel suficiente agua para cubrirlo por 5 minutos, haciendo vacío a 55 mbar. Se retiró el agua y se agregó solución alcalina (NaOH 50 mM, NaCl 10 mM) de la misma manera y se hizo vacío por 5 minutos a 55 mbar, y se retiró esta solución. Se agregó solución neutralizadora (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4) suficiente para cubrir la superficie del gel y se hizo vacío a 55 mbar, y se retiró esta la solución. Después se agregó abundante solución de transferencia 20X SSC (NaCl 17.5%, Tris-citrato de sodio 8.82 %, pH 7) suficiente para cubrir 2 veces la altura del gel y se hizo vacío a 55 mbar por 1 hr. Después se lavó la membrana en buffer 20X SSC (NaCl 17.5%, citrato de sodio 8.82 %, pH 7) por 2 minutos y se entrecruzó utilizando el programa C3 (150 mJoules) en un crosslinker.

Generación de Sonda Homóloga Radioactiva Marcada por Random Primers

El marcaje de la sonda se hizo por el método de random primers (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) incorporando nucleótidos marcados con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), con el fin de utilizarla para hybridizar con el RNA mensajero inmovilizado en membrana.

Para el marcaje se utilizó 3 μl del oligonucleótido CatnFw 20 μM , 4 μl del oligonucleótido CatnRv 6.6 μM , 2 μl de dATP 0.5 mM, 2 μl de dGTP 0.5 mM, 2 μl de dTTP 0.5 mM, 5 μl de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) 10 mCi/ml, 6000 Ci/mmol, 15 μl de random primers (D.O. 260 nm 18 U/ml en HEPES

0.67 M, Tris-HCl 0.17 M, MgCl₂ 17 mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, BSA 1.33 mg/ml, pH 6.8), 2.5 µl de DNA (producto de PCR 265 purificado, 10 ng/µl, previamente desnaturalizado a 100°C por 5 minutos), 1 µl de Klenow 2 U/µl (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 13.5 µl de agua para tener un volumen final de reacción de 50 µl, se incubó por 1 h a 25°C y se añadió 5 µl de solución stop. El producto de la reacción se precipitó con etanol absoluto y se resuspendió en 50 µl de agua estéril, se tomó 1 µl y se aplicó al filtro de fibra de vidrio para cuantificación en contador de centelleo.

Hibridización de Sonda

La membrana se prehibridizó por 30 minutos a 65°C en baño de agua en solución de pre-hibridación (SSC 5X, solución Denhardt's 5X, SDS 0.1 %, 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque previamente desnaturalizado a 100°C por 10 minutos en baño de agua y puesto en hielo hasta su uso). Después se hibridizó por 22 h en 10 ml de solución de hibridación (SSC 5X, solución Denhardt's 5X, SDS 0.1 %, 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque y 112.7X10⁵ cpm totales de sonda radioactiva previamente desnaturalizados a 100°C por 10 minutos en baño de agua) a 65°C en baño de agua. Como controles positivos se utilizaron 10 ng del plásmido pPVCat-1 y 200, 100 y 10 ng del producto de PCR 265 y como control negativo se utilizó 10 ng de un clon de HDL.

Después de la hibridación, las membranas se lavaron 2 veces por 15 minutos a temperatura ambiente en solución SSC 2X, SDS 0.1%, 2 veces por 15 minutos a 60°C en solución SSC 2X, SDS 0.5 %, 1 vez por 15 minutos a 60 °C en solución SSC 0.2X, SDS 0.1% y 1 vez por 15 minutos a a 68°C en solución SSC 0.1X, SDS 0.1 %. La membrana se expuso a película de rayos X Biomax por 456 h y se reveló por 5 minutos en solución reveladora (Kodak), se lavó en agua destilada por 30 segundos, se fijó por 10 minutos en solución fijadora (Kodak), se lavó en agua destilada por 30 segundos y finalmente se lavó con agua desionizada.

Determinación del Tamaño del Mensaje de Hemocianina de *P. vannamei*

La determinación del tamaño del mensaje de hemocianina de *P. vannamei* se realizó como un control del proceso de la técnica de Northern blot. Para ello se realizaron 2 aislamientos de RNA mensajero a partir de 112.8 µg de RNA total de hepatopáncreas cada vez, de acuerdo al protocolo de Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (DynaL, Oslo Noruega). Los volúmenes de elusión se juntaron y se concentró a 11 µl en un SpeedVac y se tomó 1 µl para cuantificación en placa por medio de la técnica de cuantificación por ensayo en placa con bromuro de etidio (Yepiz-Plascencia, 2000). Para la inmovilización del RNA mensajero en membrana, primero se corrió una electroforesis de RNA en gel de agarosa-formaldehído de la manera ya descrita anteriormente y se transfirió de acuerdo al protocolo de VacuGene XL (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

La sonda que se utilizó se marcó con digoxigenina por PCR. El DNA molde que se utilizó se obtuvo por PCR de acuerdo a la siguiente reacción : 5 µl de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 7.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 µl de oligonucleótido sentido HEMF 100 µM con las siguientes características: 81.5°C de temperatura de alineación, la posibilidad de formación de estructura secundaria es débil, no forma primer-dímeros y la secuencia es 5'GGGAATTCCATATGTTTCAGGTGGCCAGTGCAGATG3' y 1 µl de oligonucleótido antisentido HEMR 100 µM con las siguientes características: 78.9°C de temperatura de alineación, la posibilidad de que forme estructura secundaria es débil, no forma primer dímeros y la secuencia es 5'CGCGGATCCTTAATG AATGTGTTCACCATGAATG3'. Estos oligonucleótidos se diseñaron en base a la secuencia del GenBank con número de acceso GI: 854402. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% y el fragmento de 2 Kb correspondiente se purificó cortando la banda del gel y el DNA se extrajo con fenol de acuerdo a (Ausubel *et al.*, 1995).

Para el marcaje se incorporaron los siguientes componentes: 10 μ l de buffer PCR 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.4), 15 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 3.3 μ l de dig-dUTP 1 nmol/ μ l, 1.67 μ l de dTTP 10 mM, 2 μ l de dATP 10 mM, 2 μ l de dCTP 10 mM, 2 μ l de dGTP 10 mM, 1 μ l de oligonucleótido HEMF 100 μ M, 1 μ l de oligonucleótido antisentido HEMR 100 μ M, 3 μ l de DNA (fragmento purificado de la reacción de PCR 42), 4 μ l de *K-Taq* y 55.03 μ l de agua estéril para tener un volumen final de reacción de 100 μ l. Las condiciones de corrida fueron las del programa 1.

La cuantificación de la sonda se hizo de la forma ya descrita para sonda marcada con digoxigenina y el RNA mensajero (1 μ g) inmovilizado en membrana se prehibridizó por 1.25 h en solución de prehibridación (SSC 5X, N-laurilsarcosina 0.1 %, SDS 0.02 %, reactivo de bloqueo –aparentemente leche en polvo-1%) a 68°C en baño de agua y después se retiró esta solución y se agregó 5 ml de la misma solución y 5 μ l de sonda 100 ng/ μ l previamente desnaturalizada a 100 °C por 10 minutos y se incubó por 16 h a 68 °C en baño de agua. El control negativo fue 200 ng de la reacción de PCR 265 (proviene de pPVCat-1) y 243 ng de un clon de hemocianina XF2.3 (Felipe Ortega, 2000). Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces por 5 minutos cada vez a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X, SDS 0.1 % y dos veces por 15 minutos cada vez a 68°C con una solución SSC 0.1X, SDS 0.1 %. La detección se llevó a cabo como anteriormente se describió para la cuantificación de la sonda de catalasa marcada con digoxigenina.

Determinación del Mensaje de Catalasa en Diferentes Tejidos por RT-PCR

La detección del mRNA de catalasa se hizo por transcripción reversa y PCR (RT-PCR), utilizando cDNA equivalente a 60 ng de RNA mensajero de hepatopáncreas, músculo y bránqueas, estimados de acuerdo a la relación que dice que el RNA mensajero representa un 5% del RNA total (Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega).

La obtención de cDNAs se hizo por RT-PCR de la forma descrita anteriormente. Por otro lado, también se probó cDNA equivalente a 1.32 ng de RNA mensajero de hemocitos y cDNA equivalente a 1.5 ng de RNA mensajero de hepatopáncreas. La obtención de éstos se hizo por RT-PCR partiendo de 200 ng de mRNA de hepatopáncreas y 40 ng de mRNA de hemocitos, a los cuales se les agregó, de manera separada, 1 μ l de oligo dT 1 μ M, se llevó a un volumen de reacción de 5 μ l y se incubó a 70°C por 3 minutos y se colocó en hielo por 2 minutos. A esta mezcla se le agregó 2 μ l de buffer de primera cadena 5X (Tris 250 mM, pH 8.3, MgCl₂ 30 mM, KCl 375 mM), 2 μ l de dNTPs (5 mM cada uno) y 1 μ l de enzima transcriptasa reversa MMLV (200 U/ μ l) y se incubó por 1 h a 42°C y posteriormente 10 minutos a 75°C y después se colocó en hielo. Las ampliificaciones se hicieron con los oligonucleótidos específicos CatnFw y CatnRv y con el programa 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación y secuenciación del fragmento interno del cDNA de catalasa

Para obtener la secuencia nucleotídica completa del cDNA de catalasa del camarón blanco *P. vannamei*, se utilizó clonación de fragmentos internos amplificados por PCR usando oligonucleótidos degenerados, búsqueda por hibridización en banco de genes de cDNA de hepatopáncreas y RACE, en todos los casos usando como material inicial mRNA de hepatopáncreas.

Los oligonucleótidos degenerados CATs (sentido) y CATas (antisentido) se diseñaron en base a que la catalasa es una proteína muy conservada. Se consideraron las secuencias aminoacídicas de catalasas de humano y mosca de la fruta con números de acceso en GenBank Np_001743 y P17336 respectivamente. Las secuencias correspondientes a este par de oligonucleótidos que se encontraron en la secuencia nucleotídica determinada, se enlistan en la Tabla 1. La reacción de amplificación generó una sola banda de 0.9 Kb y corresponde al tamaño de fragmento esperado (Figura 1A).

El fragmento de 0.9 Kb amplificado por PCR se clonó en el vector plasmídico pGEM T Easy. Este sistema tiene el gen *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa. Este gen se interrumpe e inactiva al insertársele un fragmento de DNA. Esto hace que las bacterias al no tener la β -galactosidasa funcional no puedan degradar el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactosido (X-Gal), lo que facilita la identificación de recombinantes por color. Las colonias azules generalmente corresponden a clones sin inserto y aquellas colonias que no generan el color azul representan clones con inserto (Garrett & Grisham, 1995), sin embargo puede haber excepciones, cuando se

generan recombinantes de color azul como resultado de la inserción en marco de lectura continuo con *lacZ* generándose una proteína de fusión funcional que modifica el sustrato X-Gal (Promega, Technical Manual No. 042) o por tiempo de incubación de las bacterias. Las colonias se analizaron por migración de DNA superenrollado en donde se observó una migración retardada del DNA proveniente de 2 colonias azules, comparado con el DNA de colonias blancas (Figura 1B). Lo anterior explica por qué fue posible encontrar el clon de interés en colonias azules de células TOP 10 F' *E.coli* transformadas por choque térmico.

Dos clones potenciales positivos, 7 y 13, se cultivaron y el DNA plasmídico se aisló por el método de lisis alcalina, el cual fue digerido con *EcoRI* y *NotI* para la liberación y estimación del tamaño del inserto. *NdeI*, *SacI*, *ApaI*, *SpeI*, *PstI*, *SalI* se seleccionaron en base que sólo existe un sitio de restricción en el vector y fueron utilizadas para buscar sitios específicos de corte en el DNA insertado e identificar posibles diferencias entre clones; (Garrett & Grisham, 1995; Lewin, 1997). De todas las enzimas utilizadas, sólo *EcoRI* digirió el clon, liberando dos fragmentos, uno de 680 pb y otro de 220 pb cuya sumatoria es de 0.9 Kb (Figura 2). No se encontraron sitios internos en el fragmento para las otras enzimas probadas.

El DNA plasmídico de los clones 7 y 13 fue secuenciado con el oligonucleótido T7 cuyo sitio de alineación se encuentra en el vector plasmídico. El análisis de secuencia de los clones: clon7_T7 y clon13_T7 y los que se describen más adelante se hizo con el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990).

Las secuencias nucleotídicas de los clones 7 y 13, fueron también determinadas utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv en el laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática de la Universidad de Arizona, confirmando la identificación de los clones. Las secuencias nucleotídicas y el patrón de restricción de los clones 7 y 13 fueron muy similares, indicando que correspondían al mismo recombinante y fueron denominados pPVCat-1.

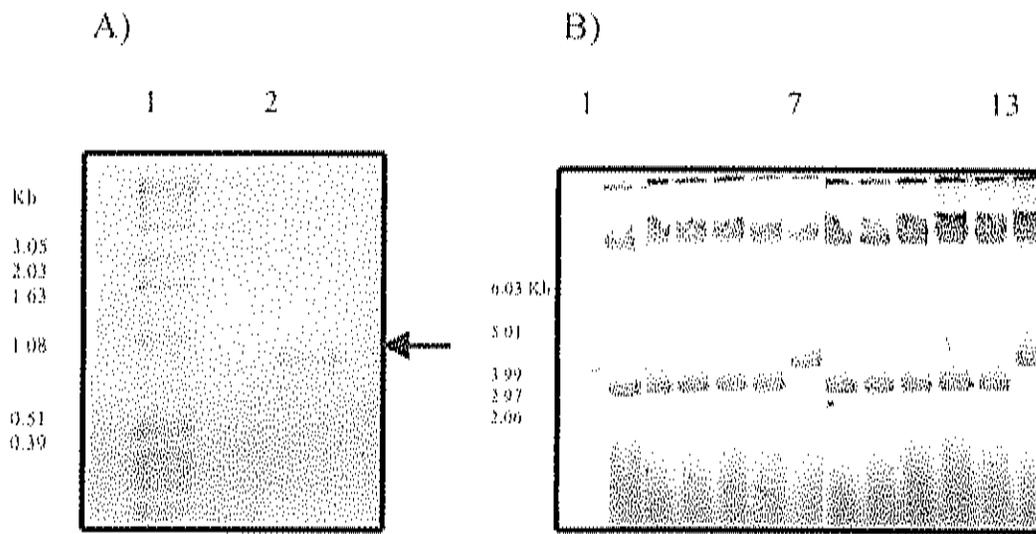


Fig.1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de DNA de catalasa e identificación de recombinantes.

Panel A. Fragmento de DNA de catalasa obtenido usando banco de genes de hepatopáncreas y los oligonucleótidos CATs y CATas Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder, carril 2: fragmento amplificado de 0.9 Kb. Panel B. DNA superenrollado e identificación de recombinantes en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: estándares moleculares de DNA superenrollado Supercoiled DNA ladder. Carril 7 y 13: clones potenciales de un fragmento del gen de catalasa del camarón blanco *P. vannamei*.

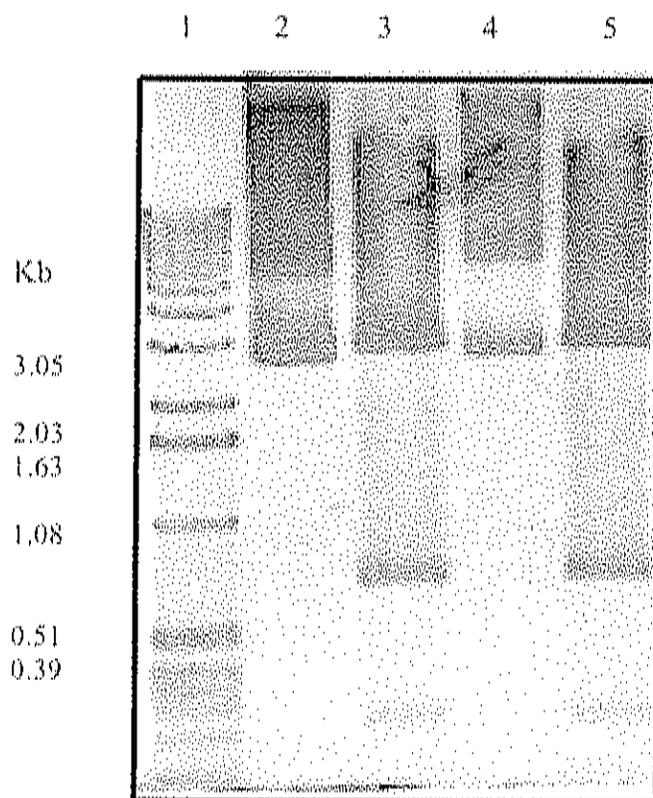


Fig. 2. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de la caracterización del fragmento de 0.9 Kb con enzimas de restricción.

Carril 1: estándar de peso molecular de DNA 1 Kb ladder. Carril 2 y 4: DNA plasmídico sin digerir de los clones potenciales 7 y 13. Carril 3 y 5: DNA plasmídico de los clones 7 y 13 digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos utilizados

Nombre	Tm °C	% GC	Estructura secundaria	Secuencia 5'...3'
CATs	86.6	57.5	Fuerte	GCCGCTCGAGTTCGGGTACTTCGAGGTGACGGCATGACATA
CATas	86.6	58.9	Moderada	GCCGCTCGAGGGCCAGTTGACGGGAATGTCGAGATAGTT
CatFw	62.7	41.6	Débil	CGTGAGTTTTACACAGAAGAA GG
CatRv	69.4	50.0	Débil	GGCGACCTTGCAACATTTTGTG
Catn2Fw	67.6	52.3	Moderada	TTGCTGAGGTGGAGCAGATTG
Catn2Rv	69.7	50.0	Débil	GGATTCCTCTTCGGGTGTGAATG
L21PRPvFw	73.2	59.0	Moderada	GGCTTCTTCCCGTTTCAGCG
L21PRPvRv	69.4	50.0	Muy débil	GCAATGAACATCAAGGCAGTGGC
HEMF	81.5	50.0	Débil	GGGAATCCCATATGTTTCAGGTGGCCAGTCCAGATG
HEMR	78.8	44.1	Débil	CGCGGATCCTTAA TGAATGTGTTCACCATGAAATG

Las bases añadidas a los oligonucleótidos CATs y CATas para propósitos de clonación están subrayados

Las secuencias obtenidas de los extremos del fragmento de 0.9 Kb fueron parciales y con bases ambiguas, por lo que se diseñaron oligonucleótidos específicos llamados CatnFw y CatnRv, cuyas características se muestran en la Tabla 1. A este procedimiento se le conoce como estrategia de *primer walking*, la cual se basa en la obtención de una secuencia inicial, a partir de la cual se diseña un nuevo oligonucleótido para obtener una segunda secuencia que se traslapa con la primera. Así sucesivamente la secuencia se extiende hasta tenerla completa (http://info.med.yale.edu/wmkeck/DNAseq/seq_by_primer_walk.html).

Los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv amplifican un fragmento de 660 pb a partir del clon pPVCat-1 como se muestra en la figura 3, el cual se secuenció con este mismo par de oligonucleótidos. Debido a que las secuencias de los clones pPVCat-1_CatnFw y pPVCat-1_CatnRv también fueron secuencias parciales se diseñaron otros oligonucleótidos específicos Catn2Fw y Catn2Rv y con ellos se secuenció el clon pPVCat-1.

La comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos obtenidas de la traducción de las secuencias nucleotídicas determinadas de ambos clones, tuvo una alta similitud con catalasas de diversos organismos, incluyendo bacterias, insectos, mamíferos, peces y nemátodos depositadas en la base de datos GenBank. La comparación con catalasas de otros organismos se muestra en la Tabla 2, confirmando la identificación de este fragmento como el correspondiente a catalasa.

Tabla 2. Longitud de las secuencias generadas del fragmento de 0.9 Kb (clon pPVCat-1) y similitud con catalasas de otros organismos

Clon_oligonucleótido	Número de bases consideradas	Similitud/Número de Acceso en base GenBank
clon7_T7	446	<i>Sinorhizobium meliloti</i> / AAC649.1
clon13_T7	335	<i>D. melanogaster</i> /P17336
clon7_M13Rv	142	<i>C. elegans</i> /T27177
clon13_M13Fw	186	<i>D. melanogaster</i> / P17336
clon13_M13Rv	373	<i>H. sapiens</i> /AAK29181.1
pPVCat-1_CatnFw	637	<i>Sus scrofa</i> /O62839
pPVCat-1_CatnRv	609	<i>S. scrofa</i> /O62839
pPVCat-1_Catn2Fw	114	<i>D. rerio</i> /Q9PT92
pPVCat-1_Catn2Rv	251	<i>C. elegans</i> /T27177

Aislamiento del cDNA a partir de un Banco de Genes de Hepatopáncreas

La búsqueda del cDNA completo de catalasa en el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas, se inició utilizando aproximadamente 350,000 pfu totales distribuidas en 7 placas de medio de cultivo. Las placas de fagos fueron transferidas a membranas; una de las membranas se utilizó para realizar la hibridización con la sonda radioactiva mientras que el resto de las membranas fueron usadas para hibridización con la sonda marcada no radioactivamente (Dig-dUTP).

En la membrana hibridizada con sonda radioactiva (denominada membrana A) se detectaron 4 clones potenciales positivos mientras que en las membranas hibridizadas con la sonda no radioactiva (denominadas membranas B) se detectaron 26 clones potenciales. Los 4 clones obtenidos de la membrana A, se sometieron a aislamiento secundario y se obtuvieron 9 clones potenciales positivos que se sometieron a PCR con los oligonucleótidos específicos, de los cuales, sólo 1 resultó positivo a la amplificación con los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv tomando como DNA molde los fagos eluidos de las zonas de lisis correspondientes.

De los 26 clones potenciales de las membranas B al hacer amplificación se obtuvo 17 reacciones positivas, los cuales se muestran en la figura 4. De éstos, 7 son los que se aprecian más intensamente que el resto. El clon secundario potencial positivo proveniente de la membrana A se sometió a aislamiento terciario y también a amplificación por PCR resultando 1 amplificación positiva. A los clones potenciales provenientes de las membranas B también se les hizo aislamiento terciario y confirmación por PCR, sin embargo no se obtuvo ninguna reacción positiva. Las figuras de las amplificaciones por PCR en aislamiento secundario y terciario no se muestran.

Aunque no se obtuvo algún clon positivo de los clones secundarios y terciarios se escogieron 6 aleatoriamente para someterlos a *In vivo excision*, aislamiento de DNA plasmídico y liberación del inserto con *EcoRI* y secuenciación de nucleótidos. Al digerir los plásmidos se generaron bandas de diferentes tamaños.

Por ejemplo para el clon 1.3aB se tuvieron 4 bandas siendo de 700 pb la mayor, mientras que el clon 7.3aB liberó un inserto de 2 Kb. Estos dos clones se secuenciaron y las secuencias corresponden a una hemocianina y serin carboxipeptidasa, cuyas secuencias se muestran en el apéndice. El resto no se secuenció ya que mostraron patrones de restricción muy parecidos a los escogidos.

La búsqueda convencional de fragmentos de cDNA contenidos en bancos de genes se hace por hibridación. Este método es laborioso, requiere de bastante tiempo y puede producir falsos positivos. Tal fue el caso en la búsqueda del clon de catalasa en el banco de genes de cDNA de hepatopáncreas. Este efecto se pudo deber a una baja densidad del cDNA de catalasa en el banco de genes y a una baja astringencia en las condiciones de PCR. Existe un método que utiliza la amplificación de los fagos propagados en bacterias de *E. coli* y un aislamiento por PCR utilizando un par de oligonucleótidos específicos y un tercer oligonucleótido interno en la región amplificada por el primer par, y actúa como sonda, con lo cual el producto amplificado se puede confirmar al hibridizar con este tercer oligonucleótido (David, 1993).

Las consideraciones técnicas también son importantes, tales como el título del banco de genes, establecer la existencia previa del gen en el banco de genes y eliminar falsos positivos en las reacciones de PCR hibridizando con sondas. Este procedimiento se puede aplicar a cualquier gen del cual se tenga información de la secuencia para el diseño de los oligonucleótidos para PCR y para la sonda interna. Este método puede sustituir al aislamiento convencional cuando éste produce una alta proporción de falsos positivos, ya que es más astringente debido a la propagación de los fagos y a los tres oligonucleótidos que se utilizan para la selección de positivos reales (David, 1993).

El cDNA completo de catalasa no se obtuvo por la vía convencional de búsqueda en banco de genes, por lo que se decidió aplicar una estrategia alternativa para obtener los extremos faltantes del cDNA donde se utilizó la técnica conocida como amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE). Este método asegura la amplificación sólo de mRNAs completos eliminando del proceso los mRNAs truncados para obtener extremos 5' y 3' completos (Innis *et al.*, 1999, Weaver, 1999).

Aislamiento de RNA Total para RACE, Northern blot y RT-PCR

Se trabajaron muestras de hepatopáncreas, branquias y músculo utilizando el reactivo TRIZOL que es una modificación al método de Chomezynsky & Sacchi, 1987. Durante la homogenización de la muestra, el TRIZOL mantiene la integridad del RNA, mientras que lisa las células. Con la centrifugación previa adición de cloroformo se separan dos fases, una acuosa y otra orgánica, en la primera se encuentra el RNA que se precipita con isopropanol. A las muestras de RNA total se les determinó concentración por espectrofotometría y se muestra en la Tabla 3.

Para evaluar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa. Para cada muestra se calculó el volumen necesario para cargar 30 µg de RNA total, lo cual se muestra en la Figura 5A. Para las tres muestras se observó un patrón de buena calidad basado en la presencia de la banda de RNA ribosomal característica de aproximadamente 2.1 Kb.

Confirmación del Mensaje de Catalasa

La presencia del mensaje de catalasa por RT-PCR sólo se investigó en hepatopáncreas, tejido en el cual ya se ha demostrado la catalasa. Para evitar amplificaciones del tipo "falsos positivos" a causa de posible contaminación con DNA genómico, el RNA se trató con DNasa y se evaluó por RT-PCR, observándose un patrón de bandas consistente al amplificar con oligonucleótidos específicos de HDL (Romo-Figueroa *et al.*, datos no publicados). Para la evaluación de catalasa los oligonucleótidos utilizados fueron CatnFw y CatnRv, y se obtuvo el fragmento de tamaño

esperado, 660 pb de acuerdo a la posición que ocupan este par de oligonucleótidos en la secuencia del clon pPVCat-1 (Figura 5B). Con ello las bandas obtenidas para catalasa son reales y confiables.

Amplificación Rápida de Extremos de cDNA

Después de confirmar la presencia del mensaje de catalasa por RT-PCR en la preparación de RNA total de hepatopáncreas, se procedió con la amplificación de los extremos del cDNA de catalasa, por medio de la estrategia RACE. Tomando como referencia la posición de los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv en la secuencia nucleotídica parcial de catalasa y la longitud de la secuencia de aminoácidos de esta proteína en *C. elegans* (GI: 7510205) y considerando que catalasa es una enzima muy conservada se esperaban tamaños aproximados de 1.1 y 1.2 Kb para los extremos 5' y 3', respectivamente. En el sistema utilizado se incluye como control amplificaciones del gen de la β -actina de células HeLa, en los cuales se obtuvieron los fragmentos de tamaño esperado, de 0.9 y 1.8 Kb, para los extremos 5' y 3', respectivamente (GeneRacer Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA), (Figura 6A).

En las amplificaciones del cDNA de catalasa se obtuvieron varias bandas con tamaños en el rango de 0.6 a 2 Kb, con un barrido en el fondo, debido a que las condiciones de PCR aún no estaban optimizadas (Innis *et al.*, 1999); por lo que fue necesario hacer reamplificación anidada (Nested) de los extremos 5' y 3' respectivamente incrementando la especificidad del RACE (Innis *et al.*, 1999). Se utilizaron los oligonucleótidos GeneRacer 5' Nested y CatnRv para el extremo 5' y con GeneRacer 3' Nested y CatnFw para el extremo 3'. Sin embargo, no fue posible obtener una sola banda. Por ejemplo, en la correspondiente al 3' se obtuvieron varias bandas, entre las cuales las de tamaños de aproximadamente 0.8 y 1.4 Kb fueron las más intensas, como se muestra en la Figura. 6B.

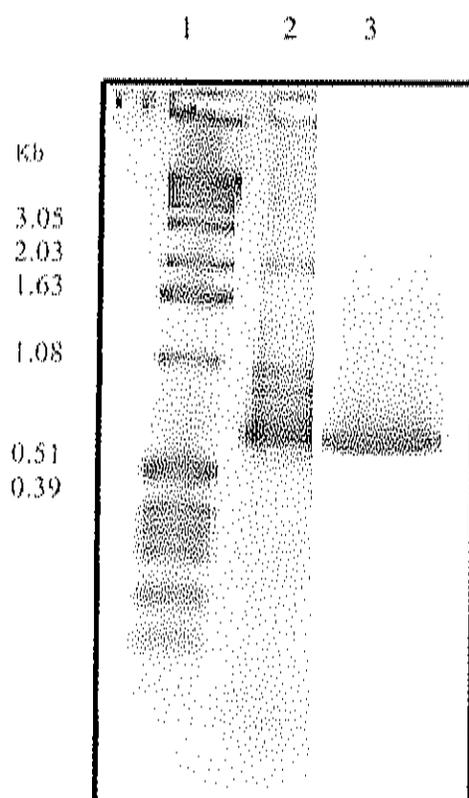


Fig. 3. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % del fragmento de 660 pb.

Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder, Carril 2: fragmento de 660 pb a partir del clon pPVCat-1 y los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv., Carril 3: fragmento de 660 pb purificado.

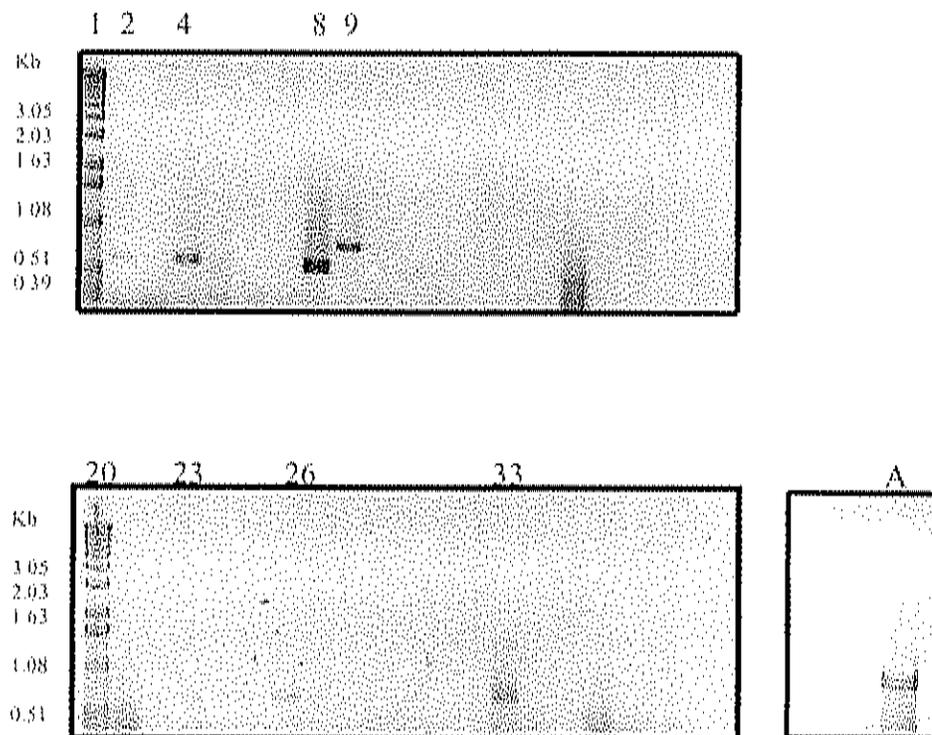


Fig. 4. Análisis electroforético de los clones potenciales positivos en el aislamiento de banco de genes.

Carril 1 y 20: estándar de peso molecular de DNA 1 Kb DNA ladder. Carriles 2, 4, 8, 9, 23, 26 y 33 generaron un producto de amplificación con los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv. Carril A: control positivo, 1 ng de clon pPVCat-1 evaluado con los oligonucleótidos CatnFw y CatnRv.

Tabla 3. Concentración y rendimiento del RNA total extraído de hepatopáncreas, branquias y músculo.

Tejido	Peso del tejido (mg)	Concentración RNA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μg totales	Rendimiento RN/ mg /g de tejido
Hepatopáncreas	1130	2.68*	1608	1.42
Branquias	240	1.12	448	1.86
Músculo	1150	0.68	272	0.23

* Promedio de las tres alícuotas de hepatopáncreas.

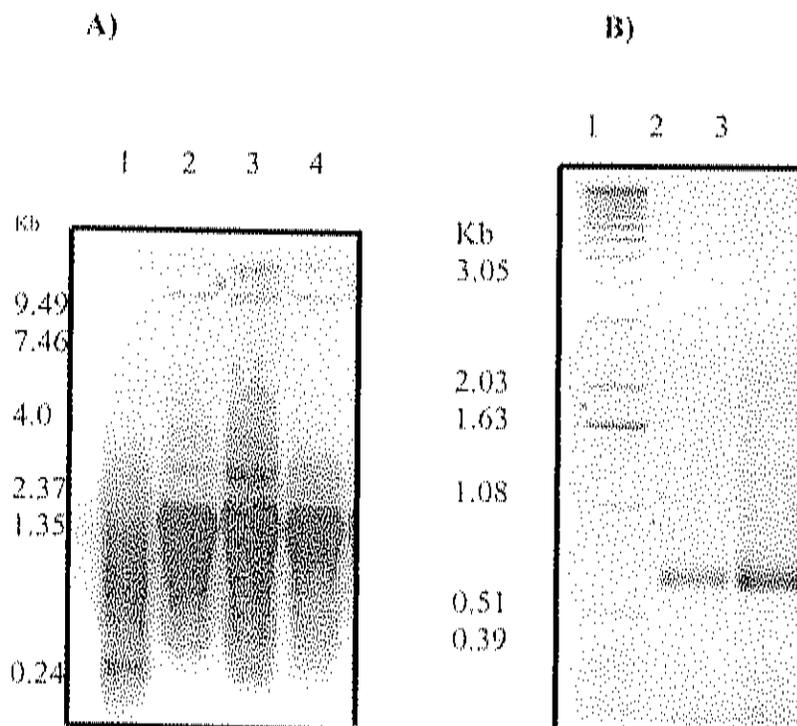


Fig. 5. Análisis electroforético de RNA total de diferentes tejidos y RT-PCR de catalasa.

Panel A. Análisis electroforético de RNA total de diferentes tejidos en gel de agarosa en condiciones desnaturizantes. Carril 1: estándar de peso molecular de RNA 0.24-9.49 Kb. Carril 2: RNA total de hepatopáncreas. Carril 3: RNA total de branquias. Carril 4: RNA total de músculo. Panel B: Análisis electroforético de las reacciones de RT-PCR para confirmación del mensaje de catalasa en RNA de hepatopáncreas. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2 y 3: fragmentos de 660 pb obtenidos con 32 y 96 ng de cDNA equivalentes de mRNA.

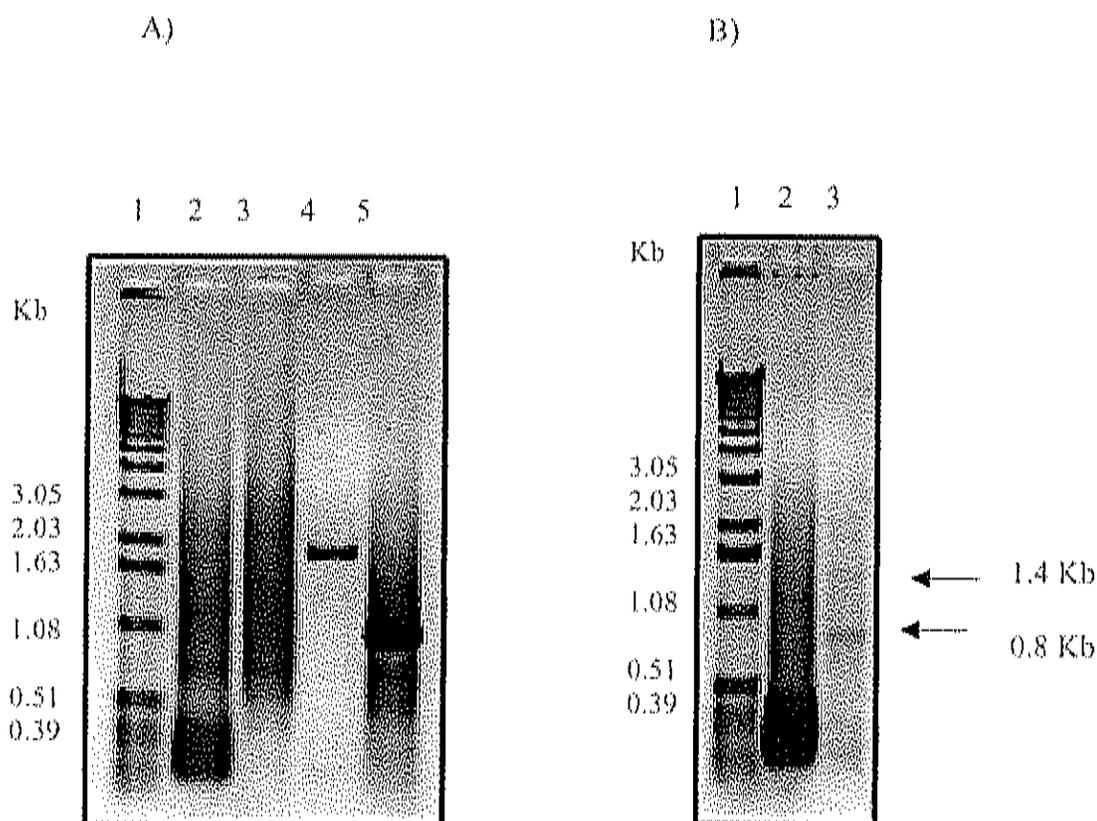


Fig. 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % de amplificaciones RACE.

Panel A. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2 y 3: primer intento de amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de catalasa respectivamente. Carril 4 y 5: producto de las amplificaciones de los extremos 3' y 5' de la muestra control. Panel B: Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % de reacciones RACE de los extremos 5' y 3'. Carril 1: estándar molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: producto de reamplificación del extremo 5' del cDNA de catalasa. Carril 3: fragmentos producto de la reamplificación a partir de la amplificación del extremo 3' del cDNA de catalasa.

Por otro lado, al no obtenerse el producto deseado en la reamplificación del extremo 5' se realizó una nueva amplificación con los oligonucleótidos GeneRacer 5' y CatnRv aumentando la temperatura de alineación hasta 68 °C para favorecer la amplificación selectiva del cDNA de catalasa (Don *et al.*, 1991; Roux, 1995). Se obtuvo una banda aparentemente única del tamaño esperado (~1.1 Kb), (Figura 7A), la cual fue reamplificada con los oligonucleótidos Nested y CatnRv a las mismas condiciones (Figura. 7B). Por otro lado, se hizo una amplificación del extremo 3' con los oligonucleótidos GeneRacer3' y CatnFw a una temperatura de alineación de 60°C (Figura 8A) y se confirmó por Nested-PCR con los oligonucleótidos GeneRacer3'Nested y CatnFw (Figura 8B).

Obtención y Análisis de Recombinantes RACE

Los fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' del cDNA de catalasa de *P. vannamei*, se insertaron en los vectores pT-Adv y pGEM T Easy, y se utilizaron para transformar *E. coli*. Se escogieron colonias y se cultivaron, el DNA plasmídico fue analizado por electroforesis en geles de agarosa como DNA superenrollado (Figura 9A y 9B). De las 6 colonias escogidas de los posibles recombinantes del extremo 5' sólo 1 tuvo migración retardada, mientras que para las 6 colonias escogidas de los posibles recombinantes del extremo 3' los 6 migraron de forma retardada.

El DNA plasmídico también fue digerido con *EcoRI* y el clon correspondiente al extremo 5' del cDNA de catalasa produjo dos fragmentos de tamaños aproximados de 1.0 y 0.145 Kb que son los tamaños esperados de acuerdo la secuencia del cDNA de catalasa de *P. vannamei* (Figura 10A). Los clones correspondientes al extremo 3' también mostraron el patrón de restricción esperado generando fragmentos de 0.5 y 0.7 Kb (Figura 10B). A estos clones se les denominó pPVCat-2 y pPVCat-3, respectivamente.

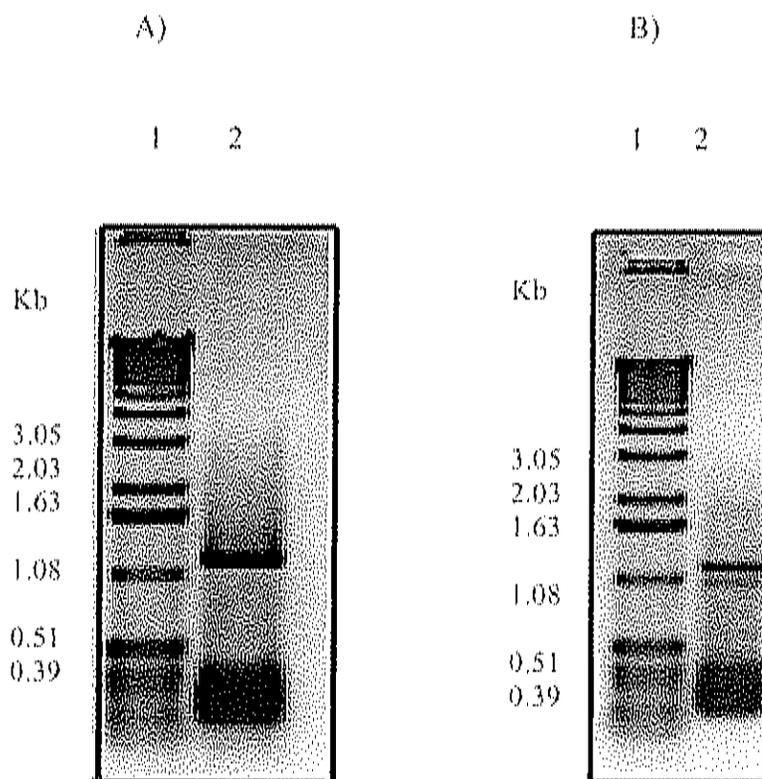


Fig. 7. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de amplificaciones RACE y Nested.

Panel A. Amplificación RACE del extremo 5'. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: fragmento de aproximadamente 1.1 Kb correspondiente al extremo 5'. Panel B: Amplificación RACE-Nested. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: producto de reamplificación hecha con los oligonucleótidos GeneRacer 5' Nested y el específico *CatnRv* y correspondiente al extremo 5' del cDNA de catalasa.

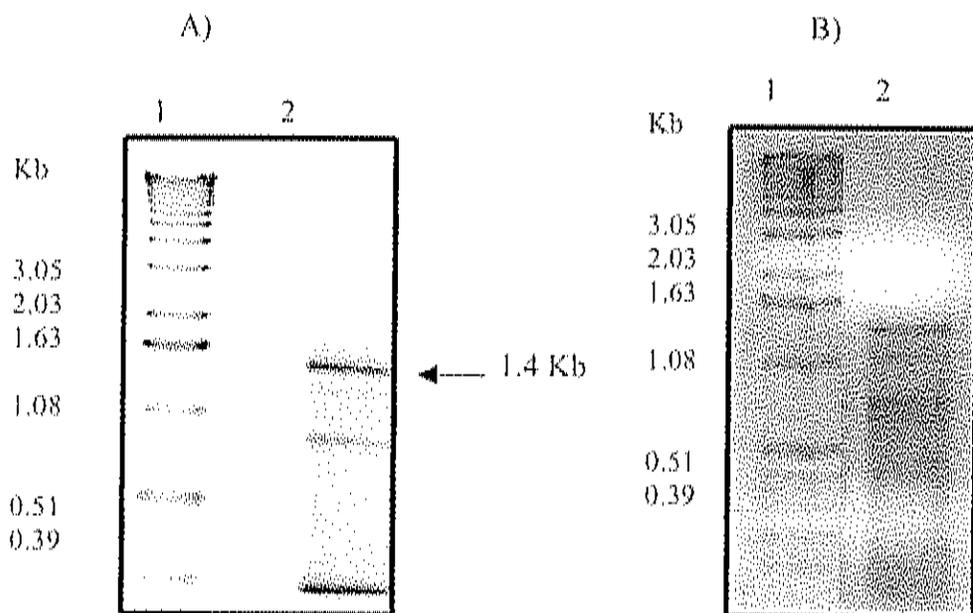


Fig. 8. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de amplificaciones RACE.

Panel A. Reamplificación del extremo 3'. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: productos de la reamplificación hecha con los oligonucleótidos GeneRacer 3' y el específico CatnFw. Panel B Reamplificación, del extremo 3' Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: productos de la reamplificación a partir del DNA de la banda purificada de 1.4 Kb de la reacción del panel A de esta figura.

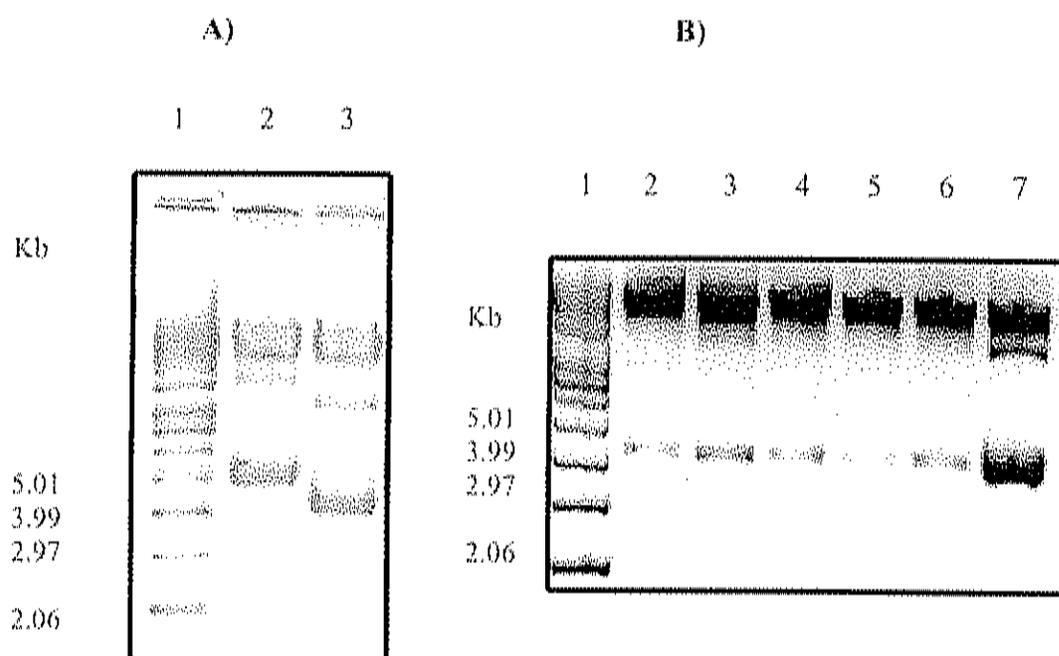


Fig. 9. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1 % de recombinantes RACE.

Panel A. Recombinante del extremo 5' Carril 1: estándar de peso molecular de DNA superenrollado. Carril 2: recombinante del extremo 5' del cDNA de catalasa clonado en el vector pT-Adv. Carril 3: control, vector sin inserto. Panel B: Recombinantes del extremo 3'. Carril 1: estándar de peso molecular de DNA superenrollado. Carril 2-7: recombinantes del extremo 3' de catalasa amplificados con los oligonucleótidos GeneRacer 3' y el específico CatnFw y clonados en el vector pGEM T Easy.

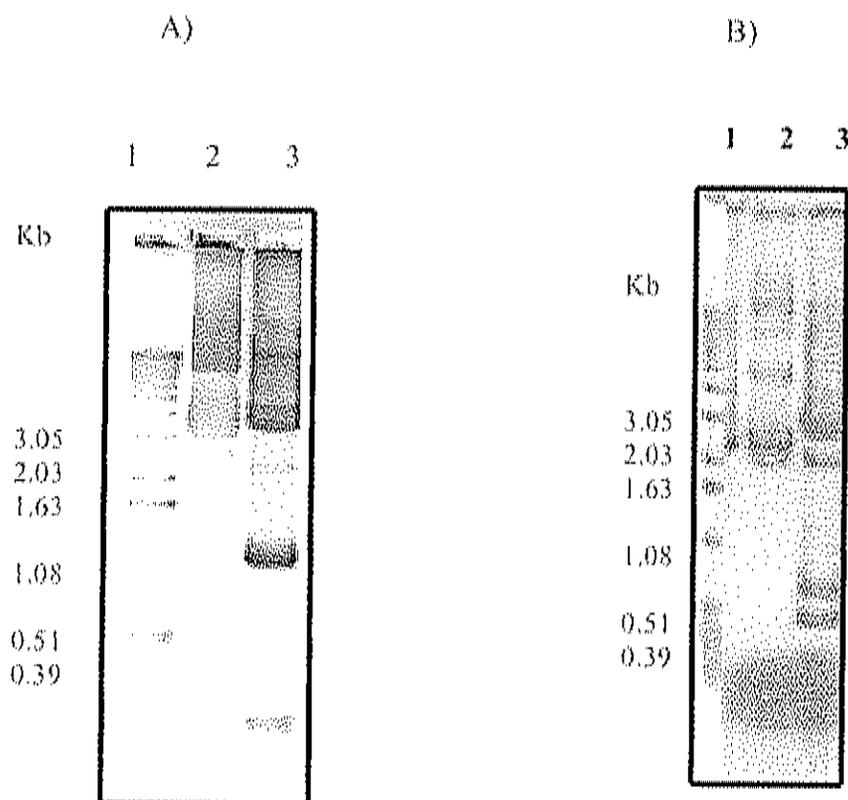


Fig. 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de la digestión con *EcoRI* de los recombinantes RACE.

Panel A. Digestión del recombinante del extremo 5' del cDNA de catalasa. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: plásmido sin digerir. Carril 3: plásmido digerido genera dos fragmentos de tamaños aproximados de 0.145 y 1 Kb.

Panel B. Digestión del recombinante del extremo 3' del cDNA de catalasa. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: plásmido sin digerir. Carril 3: plásmido digerido genera dos fragmentos, de tamaños aproximados 500 y 700 pb.

Secuenciación y Análisis de Secuencia

El algoritmo BlastX fue utilizado para el análisis de secuencia (Altschul *et al.*, 1990) y el cDNA completo alineó con catalasas de otros organismos, encontrándose la similitud más alta con la catalasa de puerco *S. scrofa* (D89812), seguida por la de los invertebrados (*D. melanogaster* y *C. elegans*) y finalmente con bacterias (*B. subtilis*), aún con un valor muy alto de 55%. Estos valores son todavía más alto, si se consideran los reemplazo conservados (Tabla 4); contrariamente a lo esperado, la homología es más alta con vertebrados que con invertebrados.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinearon con las del fragmento de 0.9 Kb (clon pPVCat-1) utilizando el programa SeqMan de Dnastar (Dnastar, MD, WI, USA) para obtener una secuencia continua o contíg (Figura 11) y que corresponde al cDNA completo de catalasa. Esta secuencia se tradujo a secuencia de aminoácidos usando la página *web* <http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/translate/>. El cDNA completo es de 1698 pb, con el codón de iniciación ATG correspondiente a Met en la posición 79, y el codón de terminación TAA en la posición 1594. La secuencia codificante es de 1515 nucleótidos que corresponden a 505 residuos de aminoácidos traducidos, a esta secuencia le preceden 78 nucleótidos que corresponden a la región no traducida 5'UTR, mientras que la región no traducida 3'UTR está compuesta por 105 nucleótidos (Fig. 12). En esta última no se detecta la poliadenilación característica de los mRNAs, tampoco fue posible identificar la secuencia del oligonucleótido GeneRacer 3' que antecede a la primera.

La secuencia de aminoácidos deducida que forma la proteína se analizó también para predecir características del polipéptido completo usando el programa Protean de DNASTAR, que calculó un peso molecular por subunidad de proteína de 57.267 kDa, con *pI* de 7.0 y carga neta (C_n) de -0.02 a pH 7.0. La composición de aminoácidos en porcentaje de frecuencia fue: aminoácidos cargados (RKHYCDE) 33.86 %, aminoácidos ácidos (DE) 12.67 %, aminoácidos básicos (KR) 12.28 %, aminoácidos polares (NCQSTY) 28.12 % y aminoácidos hidrofóbicos (AILFWV) 29.31 %.

También se comparó la secuencia deducida con catalasas de otros organismos por medio del programa Clustal X (Higgins, Bleasby & Fuchs, 1992) donde claramente se observa la alta conservación de la secuencia primaria de las catalasas (Figura 13).

Comparando estas secuencias se observa que la catalasa de humanos tiene 18 aminoácidos más en el extremo terminal carboxilo que la de *P. vannamei*, mientras que ésta es 6 aminoácidos mayor que la de puerco en el extremo terminal carboxilo. Los aminoácidos catalíticos para catalasa de *P. vannamei* se indican con asteriscos y son los residuos H-71, N-144 y Y-354, y fueron deducidos en base a la catalasa de humano (P04040) H-75, N-148 y Y-358. En la mosca *D. melanogaster* (P17336) estos residuos son los mismos H-73, N-146 y Y-356.

Se puede observar en la catalasa de *P. vannamei* que está muy conservada, principalmente en las regiones vecinas a los residuos catalíticos, indicando que el mecanismo de reconocimiento del sustrato por catalasa está dado por la estructura de la proteína (Putnam *et al.*, 2000). El sitio activo de las catalasas está localizado en una región estructuralmente muy conservada del homotetrámero y los canales que se forman hacia el sitio activo se han identificado como rutas potenciales para el flujo de sustrato y productos (Melik-Adamyán *et al.*, 2001).

Longitud del mRNA de catalasa por Northern Blot

La determinación del tamaño del mRNA de catalasa se hizo a partir de RNA mensajero extraído de hepatopáncreas. Después de la hibridación con la sonda radioactiva y la exposición a la película de rayos se detectó una banda de tamaño no esperado tomando en cuenta que la secuencia continua (contig) es de 1.698 Kb y que la catalasa de animales tiene en promedio 515 aminoácidos (Klotz *et al.*, 1997). El tamaño mínimo esperado de la secuencia codificante es de 1.5 Kb, sin embargo se esperaba que el tamaño del mensaje fuese mayor debido a las regiones no traducidas en ambos extremos del cDNA. Para *D. melanogaster* se reporta una tamaño de mensaje de 2.2 Kb (Griswold *et al.*, 1993),

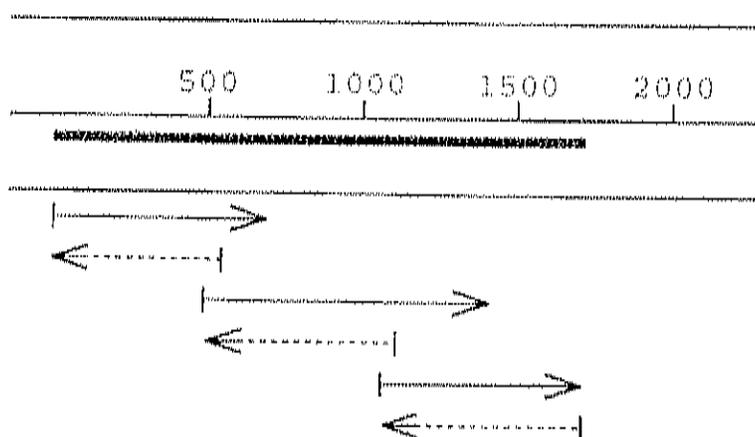


Fig. 11. Estrategia de secuenciación del cDNA de catalasa de *P. vannamei*


```

461  N F T Q V G I F Y R Q V L N E A E R Q R
1361  AACTTTACCCAAGTTGGCATTTCCTATCGTCAGGTGCTGAATGAGGCAGAACGTCAGCCT

481  L V E N I A G H M V G A Q E F I Q D R A
1441  TTGGTGGAGAACATTGCTGGTCCACATGCTTGGAGCCCAAGAGTTCATCCAGGATCGAGCA

501  I K N F T Q A D P E Y G A M I R R A I D
1501  ATCAAAAACCTTACCCAGGCTGATCCAGAATATGGTGCTAACATCCGGCGTGGATTGAC

621  K I R M S Q A S S K T *
1561  AAGATAAAGKTGAGCCAGGCTTCATCTAAAACCTTAACATATTCATGCTCTAGCTGCATCA

1621  AGCAATGGGGCCAAAGTTATAGATGTGGAAAGGTGTTGGTTGTAATATAACTTATCCAGAAG

1681  TTGGATGCGACATTTTGA

```

Fig. 12. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de catalasa de *P. vannamei*

La secuencia de los oligonucleótidos para secuenciación está subrayada. Los nucleótidos 79, 80 y 81 codifican para la metionina inicial. Los nucleótidos 1594, 1595 y 1596 representan el codón de terminación y está simbolizado con un asterisco.

<i>P. vannamei</i>	1	--MFRDKCQIQNDKIKKQQTAP--DNLTTEHCQFIDKLNSTLVGPRGF	LQDVLQIDR
<i>H. sapiens</i>	1	MADSRDPASIQOHKKEQRAKQKADLITRAENFQDKLNMVYVGRGF	LQGVVFTDQ
<i>S. scrofa</i>	1	MADNRDPASIQKHKKEQRAKQKFDLITSGENPIQDKLNLITAGPRGF	LQDVVFTDQ
<i>D. melanogaster</i>	1	-MAGRPASQITDKNSQTVS-PGASITTEHCARFICVDAASVYGRGF	LQDVVFTDQ
<i>C. elegans</i>	1	--MFRDQDQCLRTSKETYPK--QITTEHCAPVSRVAVITAGPRGF	LQDVVFTDQ
<i>B. subtilis</i>	1	-----MSSDGLTTEWQAPGIDMNSITAGRQD	LQDVVFTDQ

<i>P. vannamei</i>	57	MAHFDHERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYCKAA	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES
<i>H. sapiens</i>	61	MAHFDREIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAK	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES
<i>S. scrofa</i>	61	MAHFDREIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAK	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES
<i>D. melanogaster</i>	59	MAHFDREIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAK	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES
<i>C. elegans</i>	57	MAHFDREIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYCKAD	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES
<i>B. subtilis</i>	40	MAHFDREIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAK	FEVVGKRTFAVRVSTV	GES

<i>P. vannamei</i>	117	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD
<i>H. sapiens</i>	121	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD
<i>S. scrofa</i>	121	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD
<i>D. melanogaster</i>	119	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD
<i>C. elegans</i>	117	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD
<i>B. subtilis</i>	100	GSADTVRDPGRFAVKFYTEIGNWDLVGNNTPLFFIRDPILPESFIHQKRNPA	THLKDQD

<i>P. vannamei</i>	177	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ
<i>H. sapiens</i>	181	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ
<i>S. scrofa</i>	181	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ
<i>D. melanogaster</i>	179	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ
<i>C. elegans</i>	177	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ
<i>B. subtilis</i>	160	MVWDFWLSLRPESLHQVSLFSDRGLPDGVRHMNGYGSHTFKLVNNGEAVYCKFH	KTDQ

<i>P. vannamei</i>	237	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ
<i>H. sapiens</i>	241	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ
<i>S. scrofa</i>	241	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ
<i>D. melanogaster</i>	239	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ
<i>C. elegans</i>	237	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ
<i>B. subtilis</i>	220	GIKNLSVEBAAQLASEDDPYLRDLFNALATGKIPSWTYIQVMTFEOAEK	SNPFDQ

<i>P. vannamei</i>	297	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD
<i>H. sapiens</i>	301	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD
<i>S. scrofa</i>	301	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD
<i>D. melanogaster</i>	299	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD
<i>C. elegans</i>	297	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD
<i>B. subtilis</i>	280	KVWPHSGLYPLIPVGRVLDNRNPNYFAEVEQIAFSPANVPGI	SPDKMLQGRIFSYD

<i>P. vannamei</i>	357	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR
<i>H. sapiens</i>	361	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR
<i>S. scrofa</i>	361	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR
<i>D. melanogaster</i>	359	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR
<i>C. elegans</i>	357	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR
<i>B. subtilis</i>	340	THRRRLGPNYLQIPVNCYRARRVNYQRDGMCMQDNQGGAPNY	PNSPSPQDQ--SR

<i>P. vannamei</i>	415	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR
<i>H. sapiens</i>	419	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR
<i>S. scrofa</i>	419	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR
<i>D. melanogaster</i>	419	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR
<i>C. elegans</i>	414	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR
<i>B. subtilis</i>	399	TAPKPSVSDVLRKYGADLDNLTQVSTFYRVLNFAEYRHLVNTAGH	VGAQVTCQR

<i>P. vannamei</i>	474	A* K N F T Q A D D V Y G A N I R R A S D N I K M E Q A S S K T -----
<i>H. sapiens</i>	478	A* K N F T E V H E D D Y G E E T O A L L D K Y N A R A P K N A I H T E V R R G S H L V A R E K A N L
<i>S. scrofa</i>	478	A* K N F T E V H E D D Y G A R I O R L L D D Y N A E-----
<i>D. melanogaster</i>	479	A* K N F T Q V H A D G R M T F R I L A K E S F -----
<i>C. elegans</i>	473	M D H F E R V H P E R G A R R K A L R O K A R E S I -----
<i>B. subtilis</i>	456	Q E H F Y K A D D Y G M R A E G S L D I K K D S-----

Fig. 13. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre catalasa de *P. vannamei* y otros organismos.

Los aminoácidos catalíticos de catalasa de *P. vannamei* están marcados con asterisco, y son deducidas por similitud con catalasa de *H. sapiens* (P04040) y *D. melanogaster* (P17336). Las regiones sombreadas en negro representan los aminoácidos idénticos de catalasa de diferentes organismos, mientras que los sombreados en gris representan los reemplazos conservados.

no obstante la señal de catalasa fue aún menor de 1.5 Kb. Si bien este mRNA corresponde a mRNA parcialmente degradado, o es una migración anómala debido a estructuras secundarias del mensaje, deberá investigarse en estudios posteriores (Fig. 14).

Debido a la discrepancia de la longitud del mRNA de catalasa detectado con el esperado, se realizó un ensayo de Northern blot para hemocianina para utilizarlo como un control del proceso de inmovilización por vacío del RNA mensajero en membrana. Al amplificar con los oligonucleótidos específicos HEMF y HEMR cuyas características se enlistan en la Tabla 1 se genera un producto de 2 Kb, el cual se purificó y marcó con DIG-dUTP obteniéndose un fragmento de 300 pb que está contenido en el fragmento de 2 Kb (Fig. 15A) y se utilizó como sonda homóloga.

El mRNA de hemocianina tiene un tamaño de 2.095 Kb (Fig. 15B) que coincide con el reporte de Sellos, Lemoine & Van Wormhoudt (1997) para hemocianina de *P. vannamei*. Por lo anterior se dedujo que el proceso de inmovilización por vacío es un método eficiente y útil para realizar la técnica de Northern blot y que el tamaño detectado para el mRNA de catalasa no es un artefacto técnico, sino otro problema que no fue posible resolver.

Expresión del gen de catalasa

La catalasa, necesaria para la degradación de especies reactivas de oxígeno en sincronía con otras enzimas antioxidantes durante el metabolismo celular normal, se investigó en 3 tejidos (hepatopáncreas, branquias y músculo) utilizando RT-PCR. Se observó una clara diferencia en la abundancia de la expresión del mensaje en los diferentes tejidos, (Figura 16A). La intensidad de las bandas está en relación a la cantidad de mRNA (Weaver, 1999), lo que sugiere que el gen de catalasa tiene una alta expresión en hepatopáncreas, seguido por branquias y no se detectó en músculo. El hepatopáncreas es una glándula con gran actividad metabólica y alto contenido de lípidos (Mourente, 1996), lo cual podría sugerir que su alta actividad produce más especies reactivas de oxígeno y que para su inactivación la catalasa tiene una

Tabla 4. Porcentajes de identidad y de identidad más reemplazos conservados entre catalasa de *P. vannamei* y de otros organismos.

Organismo	Porcentaje de identidad	Porcentaje de identidad más reemplazo conservado
<i>S. scrofa</i>	71	80
<i>H. sapiens</i>	69	79
<i>D. melanogaster</i>	66	79
<i>C. elegans</i>	59	73
<i>B. subtilis</i>	55	71

importante función. Por su parte para L21, utilizado como control, la intensidad de la señal se mantiene en todos los casos indicando que los niveles de expresión en los diferentes tejidos probados es constante ya que es una proteína constitutiva (Figura 16B).

En un experimento independiente, se determinó la presencia del mRNA de catalasa en hemocitos y hepatopáncreas con 1.32 y 1.5 ng de cDNA equivalentes de mRNA, respectivamente, observándose en hemocitos una banda tenue a diferencia de la amplificación con mRNA de hepatopáncreas donde no fue posible detectar la banda (Figura 17). Lo anterior sugiere que a una concentración similar de cDNAs de ambos tejidos, la concentración de RNAs de catalasa en hepatopáncreas es menor. Ésto va de acuerdo a la sugerencia de Gross y col. (2001) quienes proponen que existe más variedad de RNAs mensajeros en hepatopáncreas que en hemocitos en base a la variedad de mRNAs detectados usando etiquetas de secuencias de expresión o EST (Expressed Sequence Tags).y dado la gran variedad de funciones que tiene el primero.

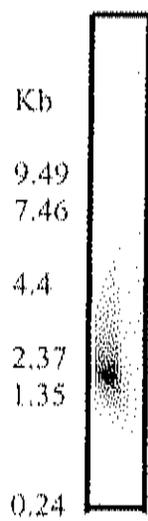


Fig. 14. Northern blot para RNA de catalasa.

Señal generada para mensaje de catalasa por Northern blot, tamaño menor al mínimo esperado de 1.5 Kb.

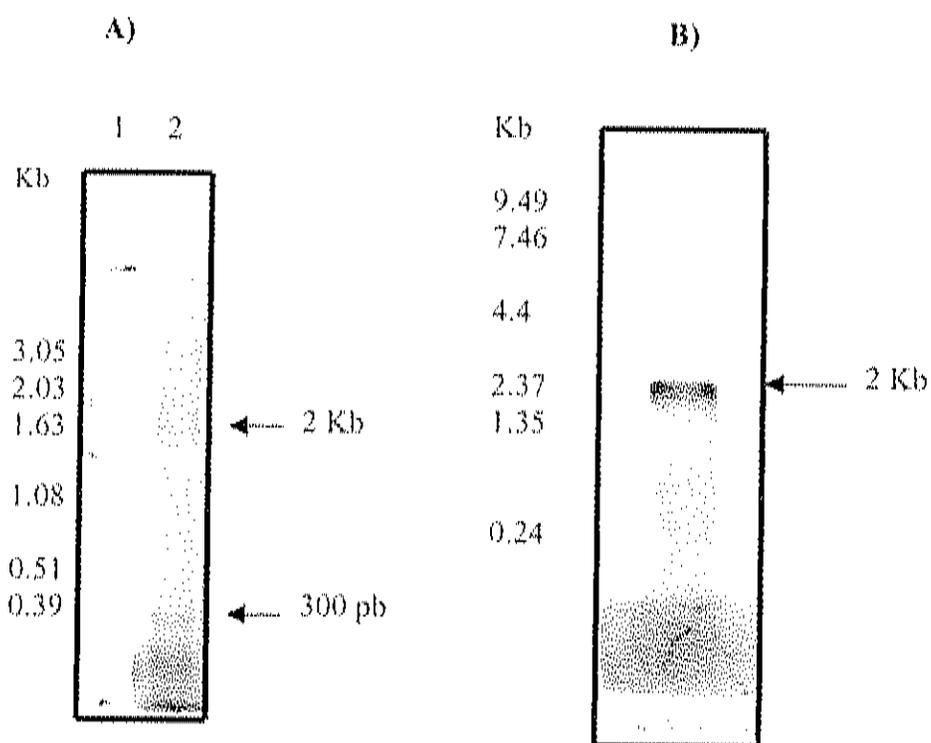


Fig. 15. Análisis electroforético de fragmentos de cDNA de hemocianina y Northern blot.

Panel A. Fragmentos de cDNA de hemocianina. Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2: fragmentos de 2.0 y 0.3 Kb amplificados con oligonucleótidos específicos HEMF y HEMR. Panel B: Análisis de la señal generada en la determinación del mensaje de hemocianina de camarón blanco *P. vannamei* con sonda homóloga.

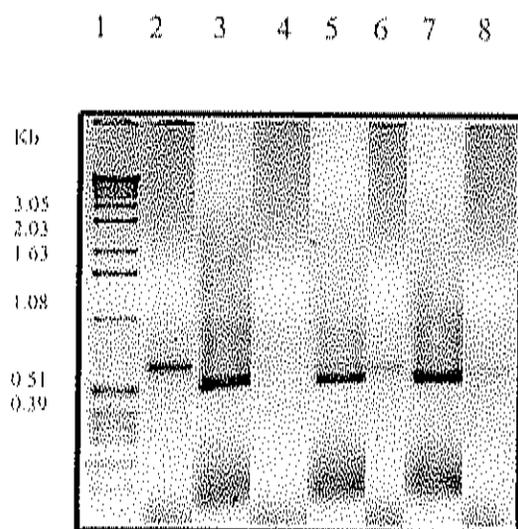


Fig. 16. Análisis electroforético de la expresión del mensaje de catalasa contra una proteína constitutiva.

Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Carril 2, 4 y 6: producto de amplificación de cDNA de catalasa a partir de 60 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de hepatopáncreas, músculo y branquias respectivamente. Carril 3, 5 y 7: producto de amplificación de la proteína constitutiva L21 a partir de 60 ng de cDNA equivalentes a RNA mensajero de hepatopáncreas, músculo y branquias respectivamente. Carril 8: producto amplificado a partir de 1 ng del clon pPVCat-1.

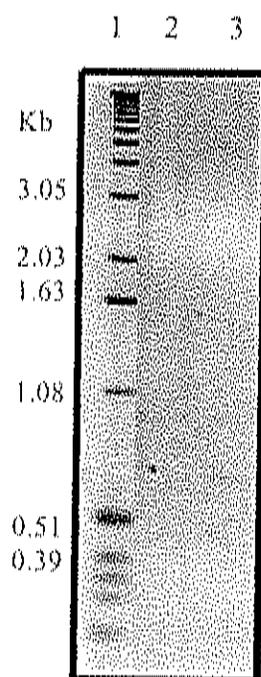


Fig. 17. Análisis electroforético en agarosa al 1 % de las ampliificaciones por RT-PCR con cDNA de hemocitos y hepatopáncreas y oligonucleótidos específicos *CatnFw* y *CatnRv*.

Carril 1: estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder, Carril 2: producto de ampliificación a partir de 1.5 ng de cDNA de hepatopáncreas. Carril 3: producto de ampliificación a partir de 1.32 ng de cDNA de hemocitos.

CONCLUSIONES

El gen de catalasa de camarón blanco *P. vannamei* es parte del sistema antioxidante. La secuencia de aminoácidos de esta enzima es altamente conservada con identidad desde 55 a 71 % con los genes correspondientes desde bacterias hasta mamíferos. El gen de catalasa se transcribe por lo menos en hepatopáncreas, branquias y hemocitos. En estudios futuros se podrá evaluar cambios en la expresión del gen de catalasa concomitante con la producción de especies de oxígeno reactivas y fundamentar su función biológica.

APÉNDICE

A continuación se enlistan las secuencias de los clones 1.3aB y 7.3aB que se obtuvieron del cribado de banco de genes de hepatopáncreas, así como también se presenta el nombre y el número de acceso de dos de las proteínas con las que alinearon al usar BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias se obtuvieron utilizando el oligonucleótido T3. Sólo se incluye la secuencia nucleotídica del inserto.

Clon 1.3aB. 812 bases

S55387 hemocyanin precursor (*penaeid shrimp*)
CAB85965.1 hemocyanin (*Litopenaeus vannamei*)

```
GGCACGAGGGTTCTTGGGCTTGTGCGCTGCRGSCGCCTTTCAGGTGGCCAGTGCAGAT
GTTTCAGCAGCAGAAAGACGTCCTTTATCTCCTGAACAAAATCTATGGAGACATTCAG
GACGGAGACCTGCTGGCTACTGCGcAATTCC'TTTGATCCCGTTGGAAACTTAGGCAGC
TACAGTGATGGTGGTGCAGCCCGTCAAAAACCTGGTGCAGGACCTTAATGACGGCAAA
CTCTTGGAGCAGAAACACTGGTTCTCCCTTTTCAATACAAGGCATCGTAATGAGGCA
CTCATGCTPTTTCGACGTCCTCATCCACTGCAAAGACTGGGCATCC'TTGTGCGCAAT
GCAGCCTACTTCCGTGAGAAAATGAATGAAGGAGAGATTTGTTTATGCCYTGTATGTT
GCCGTGATCcACTCCSTCYTTtGgSTGAACACGTGGTGCCTCCCTCCCCYCTATGAGG
TCACACCSACCTCTTTCACCMACAGTGAAGTTWTCCSAGAASCTTTWCEGTGCCAAC
VGGAGCCGAMCCcTCGSCAAWTCARSCCCCCcCTTACGGGACCARRAAAAmCCCYGAG
CACGRGAGGKGGACATTTTCKGGTGARAAWCTCGGCTTGAGAAmCACACACASGTTA
VTGTGGCATAADGGGATHYYCCCCYTSGTGAGATGATGBBTTWbGSSCTCTCYBGGGG
gTCTVARRRRRAAACTTCYTC'TGGgWDTWCMCACAMMTTACAGCYGCATDTRAGSSR
AAACKCKCCAYAACGGGA
```

```
pir||S55387 hemocyanin precursor - penaeid shrimp (Penaeus vannamei)
amb|CAAS7880.1: (882502) hemocyanin [Litopenaeus vannamei]
Length = 662

Score = 282 bits (714), Expect = 4e-75
Identities = 153/213 (71%), Positives = 160/213 (74%), Gaps = 4/213 (1%)
Frame = +3
```

```
Query: 63 VLGLVAAKAFQVASADVQQQRDVLVYLLNKIYQDIQDGDLLATANSFDPVGNLGSYSDDGA 242
VLGLVAA AFQVASADVQQQRDVLVYLLNKIYQDIQDGDLLATANSFDPVGNLGSYSDDGA
Sbjct: 6 VLGLVAAAAPQVASADVQQQRDVLVYLLNKIYQDIQDGDLLATANSFDPVGNLGSYSDDGA 65

Query: 243 AVQRLVQDLDNDGKLLDQKHWFSLEFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWASPVGNAAAYFRQKMN 422
AVQRLVQDLDNDGKLLDQKHWFSLEFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWASPVGNAAAYFRQKMN
Sbjct: 66 AVQRLVQDLDNDGKLLDQKHWFSLEFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWASPVGNAAAYFRQKMN 125
```

Query: 422 EGDFVYALYVAVIHSKXKXNTWCSDLPXMRSHNP---LSPTVKXSEMLXXANXSRRLXNS 520
 EGDFVYALYVAVIHS LP + P S ++ + S
 Sbjct: 126 EGDFVYALYVAVIHSLSAEQV--VLPPLYEVTTHLEFTNSEVLERAYRAKQKQTPGKFRSS 163

Query: 591 XEFGYGTNEXPEHEXETPFGEXLGLRXTHXLXWH 689
 GT K PE R + GE +GL TH + WH
 Sbjct: 184 FT--GTKKNPEQ-RVAYFGEDIGLN-THHVTWH 212

>emb|CAB85965.1| (A)250820 hemocyanin [Litopenaeus vannamei] Length = 671
 Score = 201 bits (507), Expect = 8e-51
 Identities = 121/246 (49%), Positives = 145/246 (58%), Gaps = 13/246 (5%)
 Frame = +3

Query: 63 VLGLVAAXA-----FQV---ASADVQQQKIDVLYLNLKIYGGIQGGDLLATANSFDFVGN 215
 +L LVAA A FQ +D Q+Q DV +LL+KIYG+I+ DL A A+SFDF G
 Sbjct: 1 LLLLVAAAAAAMPHPGFQSDAGGESDAQRQHGVNMFLLHKIYGNIRYSDLAKAADSFDPAQR 60

Query: 216 LGSYSDGGAAVQKLVQDLNDGKLLSQIHWFSLFNTRHNEALMLFDVLIHCKDWASDFVGN 395
 GSYSDGG AVQKLV+++ DGKLL+Q+HWFSLEFN R R+EALMLFDV IHCKDW +FV N
 Sbjct: 61 FGSYSDGGAAVQKLVREYKDGKLLQQRHWFSLFNPQRHEALMLFDVSIHCKDWNTFVSN 120

Query: 396 AAYFRQKMHGEEFVYALYVAVIHSKXKXNTWCSDLPXMRSHNP---LSPTVKXSEMLXXA 563
 AAYFRQKMHGEEFVYALYVAVIHS + LP + P S ++ +
 Sbjct: 121 AAYFRQKMHGEEFVYALYVAVIHSLETHV--VLPPLYEVTENLEFTNSEVLESAYRAKQT 178

Query: 564 NXSRXLXSEKPYGTXXXPEHXXRXTFSGEXLGLRXTHXLXWHXGXKXFX*DDXXXXLXGVX 743
 S GT K PE R + GE +G+ TH + WH DD
 Sbjct: 179 QKPGKFESEFT--GTKKNPEQ-RVAYFGEDIGMN-THHVTWHMFFPFWDKYSRHLDEK 234

Query: 744 XNPFVW 761
 NP W
 Sbjct: 235 GGNVFW 240

Clon 7.3aB, 771 bases

XM_042181 serine carboxypeptidase 1 precursor protein (*H. sapiens*)
 AL163818 serin carboxypeptidase-like protein (*Arabidopsis thaliana*)

GGCACGAGGCTCCTCCTCGCTCTCGCTGCGGGGCATCGGGGCTGGCTTGTCTGCCGC
 CGCTCCTTTGGATGAGGACTATGGCTATGTAACAGTCCCGTCCCGGTGCCACATGTT
 CTGGGTAATGTATCACACAGAACAGGAAGGCGATTACACCACGTACCCACTCATTAT
 GTGGCTCCAAGGAGGCCAGGGGCTTCGGGCGTCGGCTACGGAACTTTGAAGAGCT
 CGGTCCGTACGACATCAACGGAAACCGCAGGGAAGGGGCTTGGACCAAGAAAGCCAA
 CGTAATGTTTGTAGACAACCCTGTCCGGAACCGGGTACAGTTACGTTGACAGCTACAG
 TGATTTGACTGTAGACAACGCCAGATCGCCTCTGACCCYCGKGGGGCTTTKCAAGGA
 AGCTTTCAGGGTTATCCTGACATGGAAAAAaTGCcTTTCTATGTATACGCCSATCTY
 WtGGGGGATATTGAYTTTCGATTTBGTYTGGsWTTGkAYmGGTTWTAAAAAwGGKGA
 AKTTKGAGTGRTTTCCKKqGCGYKCYTTGGGRGATTYTKGGTTTHKTSCAATGGTTTT
 TKKbATATTGGGGGKTtTtTtTTYCAAATGGTTTTTGGCTWTTCCGGGGGGKYtWAD
 MTGKGGCCGSGCGYCCHRAGMCMCMGGCGTGTGMSCGCCATGgVTAGCCDCTTAAGT
 GTGGGSMMTTAGTTTTTYTATAGAGKGGCAAAMmG

ref[XP_042181.1] (XM_042181) serine carboxypeptidase 1 precursor protein (Homo sapiens)
 Length = 385

Score = 121 bits (301), Expect = 1e-26
 Identities = 63/138 (45%), Positives = 85/138 (60%), Gaps = 0/138 (0%)
 Frame = +1

Query: 70 WLSLRGIGAGLSAAAPLD-----RDYGYVTVRRGSAHMFVVMYH-TRQEGDYTTYPLIM 325
 WL L + GL+ A A +D E + YVTVR A+MFW +Y+ T +++ PL+M
 Sbjct: 13 WLLLLPLLLSLNAGAVLDWPTREGKRVWGVVTVRRKDAYMFWWLYVATNSCKRNFSLPLVM 72

Query: 226 WLQGGPGASGVGYGNFEELEDPYDINGNRREGAWTKKANVMFVDRNPVGTGYSYVDSYSDLT 405
 WLQGGPG S G+GNFEE+GP D + R+ W + A+++FVDRNPVGTG+SYV+
 Sbjct: 73 WLQGGPGSSSTGFGNVEEIGPLDSDLKPRRTTWLQAASLLEFVDRNPVGTGFSYVMGSSGAYA 132

Query: 406 VDMAQIARDXKXKKEAF 459
 D A +ASD L K F

Sbjct: 133 KDLAMVAGDMVLLKTFE 150

emb[CAB07800.1] (AL163818) serin carboxypeptidase-like protein (Arabidopsis thaliana)
 Length = 502

Score = 83.9 bits (204), Expect = 3e-15
 Identities = 45/124 (36%), Positives = 64/124 (51%), Gaps = 7/124 (5%)
 Frame = +1

Query: 52 SARGSSWLSLRGIGAGLSAAAPLDDEY--GYVTVRRGSAHMFVVMYHTEQEGDYTTYPLIM 325
 SA L R + L P+ D GYVTV A + Y K + PL++
 Sbjct: 69 SAANQEGLEKKEDELIRRLPGQFPVSPDQYGGYVTVMESAGRSFFYYFVEASEEKDSSPLLL 128

Query: 226 WLQGGPGASGVGYGNFEELEDPYDINGN-----RRESAWTKKANVMFVDRNPVGTGYSYVDS 390
 WL GGGPG S + YG +ELGP+ + + R AW AMV+P+++P G G+SY ++
 Sbjct: 129 WLNQGGPGCSLAYGALQELGPPRVHSDGKTLPRNRYAMNNAANVLFLESFASVGFPSYTNF 188

Query: 391 YSDL 402
 SDL

Sbjct: 189 TSDL 192

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B., LEWIS, R. & ROBERTS, W. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, New York, USA.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, G., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- AMES, B. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
- AMSTAD, P., PESKIN, A., SHAH, G., MIRALTO, M., MORET, R., ZBINDEN, I. & CERUTTI, P. (1991). The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* **30**, 9305-9313.
- ARUN, S. & SUBRAMANIAN, P. (1998). Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry & Physiology* **121B**, 273-277.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, USA.
- CASTRO, F. (2000). Pescando camarones y hablando en plata. *Panorama Acuicola* **5**, 58.
- CHOMCZYNSKY, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- DAVID, I. I. (1993). A PCR-base method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Research* **21**, 2627-2631.
- DAVISON, A. J., WILSON, B. D. & BELTON, P. (1984). Deterioration of axonal membranes induced by phenolic pro-oxidants. Roles of superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Biochemical Pharmacology* **33**, 3887-91.

- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K. & MATTICK, J. S. (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**, 4008.
- FELIPE ORTEGA, F. X. (2000). Caracterización de secuencias nucleotídicas parciales (ESTs, STSs) de genes del camarón blanco *Penaeus vannamei*, obtenidos con oligonucleótidos para CP-VHDL. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- FIGUEROA, C., KAWADA, M. E., MUNIZAGA, A., GONZALEZ, S., BARROS, C., KOENIG, C. & SANTOS, M. J. (1997). Subcellular localization of catalase in sea urchin (*Tetrapigus niger*) gametes: Implications for peroxisome biogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry & Molecular Biology* **118B**, 757-763.
- GARCIA, M. X., FOOTE, C., VAN, S. E., DEVREOTES, P., ALEXANDER, S., ALEXANDER, H. (2000). Differential development expression and cell type specificity of Dictyostelium catalases and their response to oxidative stress and UV-light. *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**, 295-310.
- GARRETT, R. H. & GRISHAM, C. M. (1995). *Biochemistry*. Saunders College Pub., Florida.
- GLENN, C. (1986). Temporal variation for the expression of catalase in *Drosophila melanogaster*. Correlations between rates of enzymes synthesis and levels of translatable catalase-messenger RNA. *Genetics* **113**, 919-938.
- GRISWOLD, C., MATHEWS, A. L., BEWLY, K. E. & MAHAFFEY, J. M. (1993). Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**, 781-788.
- GROSS, P. S., BARTLETT, T. C., BROWDY, C. L., CHAPMAN, R. W. & WARR, G. W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 565-577.
- HIGGINS, D. G., BLEASBY, A. J. & FUCHS, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **8**, 189-191.

- <http://arbl.evmsb.colostate.edu/molkit/translate/>
<http://genosys.com/oligos/frameset.html>
http://info.med.yale.edu/wmkeek/DNAseq/seq_by_primer_walk.html
<http://semarnap.gob.mx/ssppesca/anua97/e97a04.html>. SEPESCA.
 (<http://www.blacksci.co.uk/~cgilib/bookpage.bin?File=651>).
 (<http://www.fishfarming.com/shrimp.html>)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H. & SNINSKY, J. J. (1999). *PCR Applications. Protocols for Functional Genomics*. Academic Press, Orlando Florida.
- JOSUPEIT, H. (1999). Shrimp trade around the world. *Seafood International* **19-23**.
- KASHIWAGI, A., KASHIWAGI, K., TAKASE, M., HANADA, H. & NAKAMURA, M. (1997). Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. *Comparative Biochemistry Physiology, Biochemistry & Molecular Biology* **118B**, 499-503.
- KLOTZ, M. G., KLASSEN, G. R. & LOWEN, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 951-958.
- LARSEN, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8905-8909.
- LEWIN, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press, New York.
- MACKAY, M. & BEWLEY, G. C. (1989). The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of acatalasemic mutants. *Genetics* **122**, 643-652.
- MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. (1993). *Camaronicultura*, México, D. F.
- MATHEWS, C. K. & VAN HOLDE, K. E. (1995). *Biochemistry*, 2a. edición edition. The Benjamin /Cummings Publishing Company.
- MELIK-ADAMYAN, W., BRAVO, J., CARPENA, X., SWITALA, J., MATE, M. J., FITA, I. & LOEWEN, P. C. (2001). Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. *Proteins* **44**, 270-281.

- MISSIRLIS, F., PHILLIPS, J. & JACKLE, H. (2001). Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Current Biology* **11**, 1272-1277.
- MOURENTE G. (1996). In vitro metabolism of ^{14}C -polyunsaturated fatty acids in midgut gland and ovary cells from *Penaeus kerathurus* forskal at the beginning of sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **115B**, 255-266.
- MUÑOZ, M., CEDENO, R., RODRIGUEZ, J., VAN DER KNAAP, W. P., MIALHE, E. & BACHERE, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **191**, 89-107.
- OCEAN GARDEN. (1991). Comportamiento del mercado de camarón. Boletín **8**, 1-12
- ORBEA, A., FAHIMI, H. D. & CAJARAVILLE, M. P. (2000). Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology* **114**, 393-404.
- ORR, W. & SOHAL, R. S. (1992). The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **297**, 35-41.
- ORR, W. C., ORR, E. C., LEGAN, S. K. & SOHAL, R. S. (1996). Molecular analysis of the *Drosophila* catalase gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **330**, 251-8.
- ORR, W. C. & SOHAL, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128-30.
- PUTNAM, C. D., S., A. A., Y., B. & A., T. J. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology* **296**, 295.
- ROUX, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Applications*. **4**, 5185-5194.
- RUDNEVA, I. I. (1999). Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **122C**, 265- 71.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Segunda edición edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANFORD, J. M. & E. R., K. (1989). Identification and characterization of *catA*, a mutation causing catalase deficiency in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Bacteriology* **171**, 1492-1495.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- SELLOS, D., LEMOINE, S. & VAN WORMHOUDT, A. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vanuamei* (Crustacea, Decapoda) : structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters* **407**, 153-158.
- SOHAL, R. S., AGARWAL, A., AGARWAL, S. & ORR, W. C. (1995). Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 15671-12911.
- TAUB, J., LAU, J. F., MA, C., HAHN, J. H., HOQUE, R., ROTHBLATT, J. & CHALFIE, M. (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature* **399**, 162-6.
- VANFLETEREN, J. R. (1993). Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry Journal* **292**, 605-608.
- VEGA, M. P. & PIZARRO, R. A. (2000). Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **54B**, 121-125.
- VISICK, K. L. & RUBY, E. G. (1998). The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase. *Journal of Bacteriology* **180**, 2087-2092.
- WEAVER, R. F. (1999). *Molecular Biology*. WCB/ McGraw-Hill.

- WHEELER, J. C., BIESCHKE, E. T. & TOWER, J. (1995). Muscle-specific expression of *Drosophila* hsp70 in response to aging and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10408-10412.
- WU, G. & SHAH, D. M. (1995). Isolation and characterization of potato catalase cDNA. *Plant Physiology* **108**, 1748.
- YEPIZ-PLASCENCIA, G. (2000). Manual de prácticas. Técnicas Básicas de Biología Molecular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.

- WHEELER, J. C., BIESCHKE, E. T. & TOWER, J. (1995). Muscle-specific expression of *Drosophila* hsp70 in response to aging and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10408-10412.
- WU, G. & SHAH, D. M. (1995). Isolation and characterization of potato catalase cDNA. *Plant Physiology* **108**, 1748.
- YEPÍZ-PLASCENCIA, G. (2000). Manual de prácticas. Técnicas Básicas de Biología Molecular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.