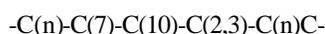


*AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA INHIBIDORES MULTIDOMINIO TIPO KAZAL EN EL CAMARÓN BLANCO

Julio Antonio Hernández González, Francisco Vargas Albores y *Patricia Hernández Cortés,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128, La Paz B.C.S. México 2300,
Fax (612) 12 54710 correo electrónico *pato@cibnor.mx

Palabras clave: Inhibidores, Kazal y multidominio.

Introducción. Los inhibidores de serin proteinasas se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, los tipo Kazal son una familia de inhibidores de serin proteinasas que distinguen por sus relaciones topográficas entre los enlaces disulfuro y la localización del sitio reactivo (P₁). La fórmula general de tipo Kazal se representa :



Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos entre las seis cisteínas que los componen y "n" representa cuando los aminoácidos son variables (1). Los inhibidores pueden tener más de un dominio, en el acocil, *Pacifastacus leniusculus*, se encontró un inhibidor con 4 dominios (2). En el camarón *Penaeus monodon* se conocen 3 secuencias que codifican para inhibidores multidominio tipo kazal, de cuatro, cinco y 6 dominios (3).

El objetivo de este trabajo es obtener la secuencia de los genes que codifican inhibidores multidominio tipo kazal en hepatopáncreas del camarón *Penaeus vannamei*.

Metodología. Se buscó indicios de inhibidores por medio de un southern del DNA genómico de *P. vannamei* empleando una sonda marcada con digoxigenina usando como templado una clona del inhibidor de hepatopáncreas de *P. monodon* y oligonucleótidos específicos. Se realizó un RT-PCR partiendo como templado RNA de hepatopáncreas de *P. vannamei* y oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de *P. monodon*. Para obtener los extremos se amplificó usando como templado una librería unidireccional de cDNA de hepatopáncreas de *P. vannamei*. Para obtener el extremo 3' y 5' se amplificó empleando los oligonucleótidos de secuencias previamente obtenidas contra los oligos de los vectores T7 y T3. Los productos se clonaron y se secuenciaron.

Resultados y discusión. En el southern se obtuvo señal, por lo se continuó con el búsqueda del inhibidor. Se obtuvo un producto de 224 pb por RT-PCR (Fig. 1). La amplificación de la genoteca derivó con un producto de 256 pb de los cuales 174 no son traducibles caracterizados por un codon de terminación TGA, una señal de poliadenilación 12 residuos río arriba de la poli (A) de 15 pb. Del producto de 224 pb se traduce a 74 aminoácidos que corresponden a dos dominios tipo kazal. En el primer dominio se tiene de la tercera cisteína a la sexta y del segundo dominio de la primera cisteína a la quinta. También se identificó el sitio reactivo que es una alanina (Fig 2).

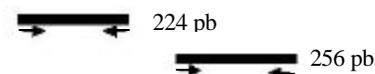


Fig. 1. Las líneas representan los productos de PCR descritos en los resultados, en cada uno se indica el tamaño del producto.

↓ VTYSNLCQLEIANCLNGGGISLAYPGECEATDGS
CDIVCTANYDPVCGSDGNTYGXACELEVADCMSDEDIISW
VTYSNLCQLEIASCLGGDVSLAHEGPC .

Fig. 2. Secuencia deducida del inhibidor. Cada línea representa un dominio. La alineación se realizó por las cisternas conservadas. El sitio reactivo está señalado con una flecha.

Del producto de 256 pb solo son traducibles a 27 aminoácidos. Se analizaron los resultados para evidenciar lasimilitud contra otras secuencias siendo de mayor homología con crustáceos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Similitud de la secuencia de 224 pb y de la secuencia traducible de 256 pb versus las secuencias de *P. monodon* y de *P. leniusculus*.

Productos	KHPA	KHPB	KHE	PAPI
Pvan14	95 %	66 %	53 %	29 %
Pvan3' TR	85 %	82 %	63 %	27 %

Conclusiones. Obtuvimos dos secuencias tipo Kazal siendo la primera dos dominios parciales y la segunda un dominio parcial del extremo 3'. El residuo P1 que codifica para alanina, sugiere que este dominio inhibe elastasa, aunque no todos los dominios son inhibidores funcionales, esto deberá ser confirmado con el aislamiento de la proteína y estudios de cinéticas enzimáticas.

Agradecimiento. Al financiado otorgados por el CIBNOR y CONACYT J28248-B.

Bibliografía.

1. Laskowsky Jr. M., & Kato I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual. Rev Biochem.* (49): 593-626.
2. Johansson M. W., Keyser P. & Söderhäll K. (1994). Purificación and cDNA cloning of a four-domain kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *Eur. J. Biochem.* (223): 389-394.
3. Hernandez P. Srintunyalucksana K. and Soderhall K. (2000). A multigene family of kazal inhibitors in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *International Marine Biotechnology Conference*, Townsville, Australia.

