



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA N66 DEL COMPLEJO P60 DEL NÁCAR EN *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856).

Josafat Jehú Ojeda-Ramírez, Delia I. Rojas Posadas, Felipe Ascencio-Valle y Norma Y. Hernandez-Saavedra\*

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, B.C.S. 23096, México

\*E-mail: nhernan04@cibnor.mx

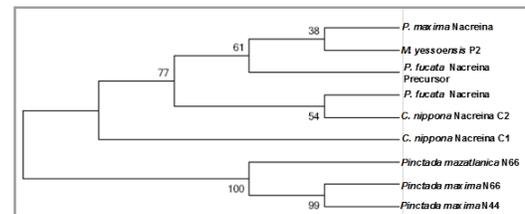
**Palabras clave:** Pearl oysters, P60 complex, N66.

**Introducción.** En las ostras perleras el metabolismo de calcio tiene un papel muy importante y puede considerarse como el centro de la actividad fisiológica<sup>(1)</sup>. Durante la formación del nácar, la matriz proteica puede controlar la mineralización de aragonita y de esta forma controlar el tamaño, cantidad, arreglo y estructura de los cristales de CaCO<sub>3</sub>. En algunas especies de ostras perleras como *Pinctada fucata*, se ha identificado y caracterizado un complejo proteico conocido como complejo P60, sin embargo, los detalles del metabolismo de calcio aun siguen siendo desconocidos<sup>(2)</sup>. En México, la industria perlera tiene un gran potencial de crecimiento debido a la existencia de dos especies de ostras perleras: la Madre Perla (*Pinctada mazatlanica*) y la Concha Nácar (*Pteria sterna*). Sin embargo, a la fecha no existe información acerca de la expresión de sus genes, de la regulación de sus proteínas o de los mecanismos implicados en la construcción de la concha y/o en la formación de perlas. El objetivo de este trabajo se centra en clonar y caracterizar el gen N66 así como, a mediano plazo, determinar su(s) posible(s) función(es) en el ciclo de calcio durante el depósito de nácar, como parte de un proyecto en el que se pretenden caracterizar además de la N66 otras proteínas involucradas, así como la composición cristalográfica de las conchas de *P. mazatlanica* y *P. sterna*.

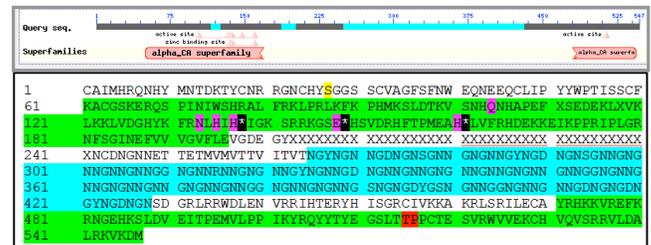
**Metodología.** Se extrajo ARN total (ARNtot) de tejido del manto de *P. mazatlanica* (Kit SV Total RNA Isolation System®, Promega) y se realizó la síntesis de ADNc (Kit First-Strand cDNA Syntesis Reaction®, Invitrogen). Se diseñaron varios pares de cebadores para el gen N66, partiendo de las secuencias reportadas en las bases de datos mundiales (GenBank®<sup>(3)</sup>) para otros moluscos y otras especies de ostras perleras. Mediante la PCR se obtuvieron amplicones específicos, que se purificaron y secuenciaron por el método dideoxy (Macrogen).

**Resultados.** Se diseñaron 7 cebadores (3 directo y 4 inverso) con los que mediante varias combinaciones se obtuvieron amplicones dentro del rango de tamaño esperado. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon, construyendo una secuencia consenso a partir del ensamblado de varias secuencias parciales. Las secuencias (incluyendo la consenso) se analizaron utilizando varios software (DNAMAN, ClustalX, MEGA5). Se compararon con las secuencias homologas de otras especies (Blastn y Blastp), se construyeron arboles

filogenéticos (fig. 1), y se analizaron las características “in silico” (fig. 2) de la proteína N66 traducida.



**Figura 1.** Árbol filogenético (máxima similitud) realizado en MEGA 5 para la secuencia de aminoácidos de N66 de *P. mazatlanica* y otras especies de ostras perleras y moluscos.



**Figura 2.** Características “in silico” de la proteína N66 de *P. mazatlanica* obtenidas mediante el análisis de la traducción de la secuencia de nucleótidos consenso obtenida.

**Conclusiones.** La proteína N66 presenta regiones altamente conservadas, entre los organismos del Phylum molusca, además se observa la persistencia de las características y zonas que conforman los diferentes dominios de la proteína. Se trata de una proteína de aproximadamente 547 aminoácidos que presenta el dominio CA que la ubica en la superfamilia de las  $\alpha$ -anhidrasa carbónica.

**Agradecimientos.** A CONACyT por la beca 204030, al CIBNOR por el financiamiento a través del proyecto EP3.0 y a Perlas del Cortez y Creaciones Azul Arena, por la donación de los organismos.

### Bibliografía.

1. Addadi L, Joester D, Nudelman F y Weiner S (2005). *Chem.* 12:980–987.
2. Checa A y Rodríguez-Navarro A (2001). *Proc Biol Sci.* 268:771–778.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>