

CLONACION DEL GEN *MIH* DE *Litopenaeus vannamei*: LOCALIZACION DE INTRONES Y COMPARACION CON GENES HOMOLOGOS EN *Litopenaeus stylirostris* y *Penaeus californiensis*.

Hever Latisnere-Barragán, y Humberto Mejía-Ruiz . CIBNOR. Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo Santa Rita, CP 23090, La Paz, B.C.S. fax 112-53625. hmejia@cibnor.mx

Palabras clave: *MIH*, neuropéptido, PCR, camarón.

Introducción. El RNA mensajero del gen que codifica la hormona inhibidora de la muda en *Litopenaeus vannamei* (*LvMIH*) ha sido descrito con anterioridad (Sun 1994). Sin embargo, no se ha establecido sus características genómicas. Aquí, nosotros describimos la localización de un intrón dentro del péptido maduro de *MIH*, además describimos que el gen clonado corresponde a *MIH* expresado exclusivamente en el cerebro, y que difiere en la secuencia de los 5 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo del péptido previamente descrito (Sun, 1995). Presentamos el análisis comparativo de los genes homólogos en el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y el camarón café del pacífico (*Penaeus californiensis*).

Objetivo: Caracterizar el gen *MIH* y estudiar su regulación en camarones peneidos de interés comercial.

Metodología. El DNA fue extraído por el método de Sambrook y col. (1989), a partir de tejido muscular de camarón adulto. Los primers *MIHF/R1* y *MIHF/R2* se diseñaron en base a la secuencia del RNAm de la *LvMIH* (GenBank: S73824). Las reacciones de PCR se obtuvieron con Taq polimerasa (Roche) y buffer con Mg, y los productos se visualizaron en geles de agarosa. Posteriormente, los productos de PCR se aislaron y clonaron para secuenciarlos. El análisis de las secuencias se realizó mediante el paquete DNASTar.

Resultados y Discusión. La figura 1 describe dos productos de la amplificación con los primers *MIHF/R1* y *MIHF/R2* de 965 y 930 pb respectivamente en la muestra de DNA genómico de *L. vannamei*, lo cual nos sugirió la presencia de intrones en cada uno de las regiones lo cual fue confirmado por el análisis de secuencia del fragmento clonado de 965 pb. El intrón 1 del gen *LvMIH* presenta sitios AG-GU típicos de invertebrados.

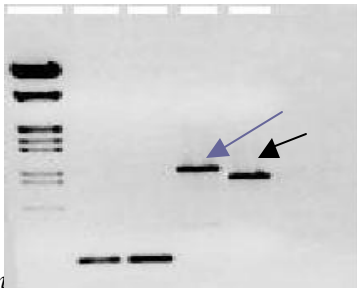


Fig 1. Amplificación de DNA genómico de *L. vannamei*. Flecha gris 965pb *MIH1* y flecha negra 930pb *MIH2*.

Además, contiene repetidas en tandem tipo microsatélites lo cual sugiere polimorfismo. Las secuencias de *L. stylirostris* y de *P. californiensis* están siendo evaluadas. La secuencia deducida de aminoácidos indica que el gen clonado es el que se expresa solo en el cerebro del camarón. No obstante, su región carboxilo terminal, poco conservada entre los *MIH* de crustáceos decápodos, difiere en los 5 últimos residuos del péptido originalmente reportado. La figura 2, señala la alineación de proteínas entre *MIH* de *L. vannamei* y su homólogo en *Procambarus bouvieri*.

Alineación de Proteínas según Lipman-Pearson
MIH_PVAN/MIH_PROBO = 60.7%

```
DTFDHSCCKGIYDRELFRKLDRCVDCYNLYRKPYPVATECKSN  
: .FD: :CKGIYDR. :F:KL:VC:DCYNLYRKP VAT.C: .NC  
QVFDQACKGIYDRAIFKKLELVCCDCYNLYRKPVATTCRENC
```

```
FVNKRFNVCVADL  
: .N. F. C: .DL  
YANSVFRQCLDDL
```

Conclusiones. *LvMIH* preseta un intrón con un sitio de “splicing” del grupo nuclear en la región codificadora del gen, también conservada en otros crustáceos. En este caso, el intrón 1 puede ser evaluado para polimorfismo ya que presenta un microsatélite perfecto. Las secuencias respectivas de *LsMIH* y *PcMIH* están siendo confirmadas, sus respectivas amplificaciones de DNA genómico, sugieren que también tienen intrones aunque en el caso de *P. californiensis* el tamaño del intrón es mas corto y, según el primer análisis de secuencia, probablemente posea mas de una isoforma. La confirmación de estos datos será presentada en el trabajo final.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el convenio de colaboración CICESE-CIBNOR, con la Dra. Elizabeth Ponce, durante el año 2000.

Bibliografía.

1. Sun, PS. (1994) Molecular cloning and séquense análisis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 1-6.
1. Sun, PS. (1995) Expresión of the molt-inhibiting hormone-like gene in the eyestalk and brain of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol and Biotech.* 4 (3) 262-268.
2. Sambrook J, Fritsch EF, and T. Maniatis 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. *CSHL Press USA* 2d edition.