

REPRESENTATIVIDAD DE ETIQUETAS DE SECUENCIAS EXPRESADAS (EST) EN BANCOS DE GENES DE cDNA DE CAMARON BLANCO *Penaeus vannamei*

Gloria Yepiz-Plascencia, Rogerio R. Sotelo-Mundo y Francisco Vargas-Albores. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). A. P. 1735. Hermosillo Sonora México 83000 Fax (6) 280-00-55

Correo electrónico: gyepiz@cascabel.ciad.mx

Palabras clave: *expresión, inmunología de invertebrados, secuencias*

Introducción. La generación de secuencias parciales de genes expresados, comunmente llamados EST del inglés *Expressed Sequence Tags* (1) han sido de gran utilidad como marcadores genéticos, indicadores de expresión, etc. En camarón blanco, se cuentan con varios cientos de estas secuencias depositadas en el banco de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). En nuestro laboratorio estamos interesados en la caracterización y expresión de genes de proteínas involucradas en el sistema inmune y en el transporte de lípidos, así como la comparación de sus niveles de expresión con proteínas constitutivas. Para esto, se han diseñado oligonucleótidos degenerados para ser usados en la búsqueda de cDNAs específicos, así como de secuencias de ESTs del GenBank. Estos oligonucleótidos están siendo utilizados para estudiar el efecto de estímulos sobre la expresión de los genes.

Metodología. Para construir los bancos de genes de cDNA se utilizó Zap-Express (Stratagene) y mRNA poliadenilado de hepatopáncreas o hemocitos de camarón. Los fragmentos de DNA se obtuvieron por amplificación por PCR usando como y DNA templado el banco de genes de cDNA o cDNA obtenido por RT-PCR de mRNA y oligonucleótidos diseñados en base a secuencias Nterminal o internas de las proteínas de interés. También se usaron secuencias parciales obtenidas en el laboratorio y la información disponible en GenBank para diseñar oligonucleótidos correspondientes a proteínas constitutivas que son usados para normalizar y comparar los niveles de expresión de los genes en respuesta a tratamientos. Los fragmentos amplificados se analizaron en geles de agarosa o poliacrilamida, se purificaron por GeneClean y se ligaron a los vectores PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) o pGEM (Promega) y se secuenciaron. Las secuencias se analizaron con el programa Blast usando la conexión con el National Center for Biotechnology Information (NCBI, (www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para evaluar los efectos de tratamientos sobre la expresión de los genes, el mRNA purificado se sometió a RT-PCR y los DNAs amplificados se analizaron por electroforesis en geles.

Resultados y Discusión. Los bancos de genes tanto de hepatopáncreas como de hemocitos contienen los mensajes comunmente aceptados como de expresión constitutiva en otros organismos, como son los de actina y de la proteína ribosomal L21. Para estos dos genes se amplificaron fragmentos de aproximadamente 700 y 500 pb, respectivamente. También se obtuvieron fragmentos de la HDL-BGBP (2) de 1800 pb, de hemocianina (3) de 1950 pb, de tripsina de 900 pb, superóxido

dismutasa (SOD) de 300 pb, catalasa de 900 pb, lisozima de 400 pb y de la proteína ribosomal S60 de 800 pb.

Hasta el momento, los resultados indican que la expresión de HDL-BGBP en hepatopáncreas, analizada por RT-PCR, es afectada por inoculación con partículas abióticas. Lo mismo ocurre con los niveles de mRNA de lisozima en hepatopáncreas y en hemocitos, probablemente relacionado con la función degradadora de paredes bacterianas en el caso de lisozima (4) y de molécula de reconocimiento de lo no-propio en el caso de la HDL-BGBP (5). Esta metodología está siendo utilizada para evaluar efectos de estímulos sobre los otros genes y de DNAs que corresponden a genes aún no identificados

Conclusiones. Los bancos de genes de cDNA contienen los cDNAs de proteínas constitutivas como actina y las proteínas ribosomales L21 y S60 y pueden ser utilizados para normalizar los niveles la expresión modificada en respuesta a un estímulo.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo de los proyectos CONACYT 029091-B, J31643-B y 31544-B

Bibliografía.

1. Adams, M. D., Kelly, J. M., Kelley, Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., Mc Combie, W. R. y Venter, J. C. (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252** (5013): 1651-1656.
2. Yepiz-Plascencia, G., Gollas T., García Bolaños, M. y Vargas-Albores F. G. T. Gollas, (2000). Synthesis of Hemolymph High-Density Lipoprotein β -Glucan Binding Protein by *Penaeus vannamei* Shrimp Hepatopancreas. *Marine Biotechnology* **2**:485-492
3. Sellos, D., S. Lemoine y Van Wormhoudt, A. (1997). Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda) : structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters* **407**: 153-158.
4. Engström, A., K. G. Xanthopoulos, Boman, H. G. y Bennich, H. (1985). Amino acid and cDNA sequences of lysozyme from *Hyalophora cecropia*. *EMBO Journal* **4**(8): 2119-2122.
5. Vargas-Albores, F. y Yepiz.-Plascencia. G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* **191**(1-3): 13-21.