



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE ARGININA
CINASA DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus
vannamei*).**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA

EMMANUEL AISPURO HERNÁNDEZ

CD. OBREGÓN, SONORA

JULIO DE 2006

DEDICATORIAS

A Dios, por concederme el don de la vida.

A mis padres Evangelina y Evodio, por todo sus consejos, apoyo, comprensión y cariño, entre otras muchas cosas que me hicieron crecer hasta la persona que hoy soy.

A mis abuelos Manuel Hernández (†), Hortensia Villa y Guadalupe Calderón (†). Por ser un ejemplo de valor, ternura y bondad en mi vida.

A mis hermanos Carlos y Alejandro y a mi hermana Eva María, pues a través de ustedes, también eh aprendido de la vida.

A mis asesores M.C. Karina García y Dr. Rogerio Sotelo, por guiarme hasta ver culminado este sueño.

A Irlanda, por ser una nueva ilusión en mi vida y por tu amistad.

A mis amigos de la carrera: Mayra, Are, Iván G., Sergio, Angy, Jorge, Edgar, José Luis, Rosita, Abisai, Adrián, Karina, Betty, Hidemi, Pau, Alma, Moncho, Iván M., Abraham, Ricardo, Karina, Fannie, Gisela, Ivette, Isaac, Miguel, Payo, Delia, Marita, Prisci, Marybeth, Gladis, Yaz y a todos los que se me escapan.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por facilitarme las instalaciones y equipo necesarios para la realización de este trabajo.

A Karina por su excelente asesoría, paciencia y amistad. Así como al Dr. Rogerio por su amistad, apoyo y supervisión.

A mis compañeros y amigos del LBMOA: Carmen, Martita, Aldo, Iván, Brody, Ale, Mariana, Arturo, Edgar, Alejandro, Adriana, Alma, Dra. Yepiz, Gracia, Oli y Cesar, por facilitar mi integración al grupo, apoyarme con mi trabajo y hacer amenas y divertidas las horas dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Yepiz y al M.C. Enrique de la Re, por su apoyo al proporcionar materiales de biología molecular para la realización de éste trabajo. Así como a la M.C. Marisela Montalvo y a la Dra. Calderón, por su apoyo con las pruebas de ELISA en el mismo.

A toda mi familia!!, especialmente la familia Hernández Acosta por su gran apoyo.

A mis revisores Dr. Francisco Cervantes, M. C. Jesús Fragoso y M.C. Roberto García por las observaciones hechas a éste trabajo.

A mis maestros del ITSON por todas sus enseñanzas, especialmente a la maestra Laura Gassós por su amistad, apoyo y por ser mí ejemplo de profesionalismo y alegría.



CENTRO DE INVESTIGACION
EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A.C.

CIAD

SEP-CONACYT-UNAM-IPN-GOBIERNO DE SONORA-GOBIERNO DE SINALOA-GOBIERNO DE CHIHUAHUA-SAGARPA

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Hermosillo, Sonora; bajo la dirección de la M.C. Karina Dalila García Orozco y fue financiado por el proyecto 41184-Z “Identificación de proteínas alergénicas de camarón mediante inmunocribado de bancos de genes de cDNA” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

M.C. Karina Dalila García Orozco

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Objetivos.	2
1.1.1.- General	2
1.1.2.- Específicos	2
II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1.- Consumo e Importancia Económica del Camarón.	3
2.2.- Alérgenos y Reacciones Alergéricas de Origen Alimentario.	5
2.3.- Enzimas Fosfo-cinasas.	6
2.3.1.- Estructura de Arginina Cinasa.	7
2.3.2.- Función Metabólica de Arginina Cinasa en Crustáceos.....	8
2.4.- Genética y Biología Molecular. Ácidos Nucleicos.....	10
2.4.1.- Bancos de genes	11
2.5.- Bioquímica de Proteínas.	13
2.5.1.- Cromatografía.....	14
2.5.1.1.- Intercambio iónico.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.- Obtención del cDNA.....	17
3.1.1.- Diseño de Oligonucleótidos.	17

3.1.2.- Amplificación del gen de arginina cinasa.....	19
3.1.3.- Electroforesis en Gel de Agarosa.....	20
3.1.4.- Purificación y Cuantificación de DNA.....	21
3.1.5.- Clonación de los amplicones en el vector de expresión pET-11a.....	21
3.1.5.1.- Digestión del gen con enzimas de restricción...	21
3.1.5.2.- Ligación en vector de expresión.....	22
3.1.5.3.- Transformación en <i>E.coli</i> ,.....	23
3.1.5.4.- Aislamiento de DNA plasmídico.....	25
3.1.6.- Secuenciación.....	25
3.2.- Purificación de Arginina Cinasa.....	26
3.2.1.- Muestra.....	26
3.2.2.- Extracción de la Proteína.....	26
3.2.3.- Precipitación con Sulfato de Amonio.....	26
3.2.4.- Purificación por Cromatografía de Intercambio Iónico.....	27
3.2.5.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	28
3.3.- Identificación de la Proteina Purificada.....	28
3.3.1.- Actividad Enzimatica de Arginina Cinasa.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1.- Obtención del cDNA.....	31
4.1.1- Diseño de Oligonucleótidos.....	31
4.1.2- Amplificación del Gen de Arginina Cinasa.....	32
4.1.3.- Clonación de los Amplicones en el Vector de Expresión pET-11a.....	34
4.1.4.- Secuenciación.....	35
4.2.- Purificación de Arginina Cinasa (AK).....	37
4.2.1.- Extracción y Precipitación de la Proteína.....	37
4.2.2.- Cromatografía de Intercambio Iónico.....	38
4.2.3.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAA).....	39
4.3.- Identificación de la Proteína Purificada.....	41

4.3.1.- Actividad Enzimatica de Arginina Cinasa.....	41
4.4.- Alergenicidad de Arginina Cinasa.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
LITERATURA CITADA	44

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar el cDNA de AK.	19
2	Composición de las reacciones para la digestión con enzimas de restricción.	22
3	Composición de la reacción de ligación al vector pET-11a	23
4	Composición de la mezcla de reacción de PCR para corroborar la ligación del inserto al vector pET-11a.	23
5	Composición de la mezcla de reacción de PCR de colonias.	24
6	Mezcla de reacción para el ensayo de actividad enzimática.	29
7	Reacción de actividad enzimática.	30
8	Oligonucleótidos específicos para arginina cinasa.	31
9	Oligonucleótidos de la genoteca SMART.	32
10	Conteo de colonias transformadas y número de colonias seleccionadas.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Estructura de arginina cinasa durante su actividad enzimática.	9
2	Representación del sitio activo de AK y su interacción con el sustrato.	9
3	Mapa de los elementos del vector de expresión pET-11a y secuencia de la región de clonación del producto de PCR.	12
4	Localización en la genoteca SMART de los iniciadores diseñados.	18
5	Condiciones de amplificación por PCR del gen AK.	20
6	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR de AK.	33
7	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR usando como templado bandas del peso esperado recortadas y purificadas.	33
8	Análisis electroforético de los productos de la amplificación por PCR de colonias.	35
9	Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pET-11a/AK.	36
10	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Precipitación con sulfato de amonio.	37
11	Cromatografía de intercambio iónico.	38
12	SDS-PAGE con efluentes de la matriz de intercambio iónico.	39
13	SDS-PAGE, AK pura y dializada contra buffer salino (NaCl 0.9%) en concentraciones alternadas de 5, 10 y 20 µg.	40
14	Actividad enzimática de arginina cinasa del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>).	42

RESUMEN

Debido a la importancia económica que el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) tiene para el país y a que es la especie de mayor consumo en la región noroeste del México, en este proyecto se utilizó este organismo como modelo de estudio con el objetivo de caracterizar a la enzima arginina cinasa (AK) y poder determinar su alergenicidad.

Un alérgeno se caracteriza por inducir la producción de inmunoglobulinas E (IgE) ocasionando la liberación de sustancias mediadoras de la inflamación como la histamina. Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo que ocasiona que una persona sea susceptible a ciertas moléculas y otras no. Para poder determinar la alergenicidad de una proteína, ésta debe encontrarse pura. Además la caracterización molecular de estos inmunógenos, permitirá realizar estudios de ingeniería genética y de proteínas en beneficio de los que padecen las alergias.

La arginina cinasa (AK, EC 2.7.3.3) es una enzima que cataliza la transferencia reversible de grupos fosforilados entre la fosfo-arginina y el ATP, siendo fundamental en el metabolismo energético de los invertebrados como el camarón.

Mediante el uso de técnicas de biología molecular se logró determinar la secuencia completa del cDNA de arginina cinasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con un tamaño de 1425 pb, a partir de la cual se dedujo una secuencia de 356 aminoácidos. Además, mediante cromatografía de intercambio iónico se purificó a homogeneidad una proteína de 40 kDa que mostró actividad de AK.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una variada cantidad de alimentos contienen componentes capaces de desarrollar un tipo de alergia. Los crustáceos, principalmente el camarón, es uno de los alimentos de origen animal que comúnmente desencadenan este tipo de respuestas inmunológicas, por lo general desagradables para el que las manifiesta.

Por otro lado, el uso de organismos genéticamente modificados o partes de estos, en productos para la alimentación humana, es un riesgo latente para personas sensibles a ciertos componentes. Aunado a esto, existe falta de información acerca de las características moleculares específicas que debe tener un alérgeno para ser reconocido por el sistema inmune, así como de los eventos moleculares que hacen que un alérgeno induzca la sensibilización de un individuo y desarrolle una reacción alérgica (Breiteneder y Ebner, 2001; Aalberse, 2002).

La posibilidad de obtener alérgenos purificados, nativos o recombinantes, en cantidades importantes es de gran utilidad para el diagnóstico, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto debido a que, para entender las características moleculares que establecen la capacidad de una proteína para provocar una respuesta inmune, se requiere un estudio sistemático que debe iniciar con la determinación de la secuencia de aminoácidos o estructura primaria, buscar su estructura tridimensional y la posible existencia de modificaciones postraduccionales, como glicosilaciones. Lo anterior, demanda cantidades importantes de la proteína.

La expresión de la proteína recombinante arginina cinasa en sistemas heterólogos, normalmente bacterias o levaduras, permitirá obtener el alérgeno en cantidades apreciables.

Por otro lado, una vez conocidas las características moleculares de una proteína alergénica, por medio de mutagénesis dirigida, se pueden localizar los aminoácidos que le confieren su alergenicidad y así producir formas hipoalergénicas de la proteína para su posible uso en inmunoterapia o en la producción de alimentos no alergénicos (Monge *et al.*, 2001; Breiteneder y Ebner, 2001).

1.1.- Objetivos.

1.1.1.- General

Caracterizar a la enzima arginina cinasa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mediante el uso de técnicas moleculares y bioquímicas para sentar las bases en estudios posteriores de la alergenicidad de la proteína.

1.1.2.- Específicos

- ? Obtener el cDNA completo de arginina cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a partir de un banco de genes de músculo.
- ? Purificar la proteína arginina cinasa a partir de músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante técnicas cromatográficas.
- ? Medir la actividad de la proteína purificada.

II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.- Consumo e Importancia Económica del Camarón.

A nivel mundial existen 342 especies de camarón con valor comercial; sin embargo, las más importantes son: el camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), blanco (*Litopenaeus vannamei*), azul (*Litopenaeus stylirostris*) y tigre negro (*Penaeus monodon*). El consumo de este producto alimenticio ha ido en constante aumento.

En el año 2002 la oferta mundial de camarón se estimó en 4.2 millones de toneladas, de las cuales, el 69 por ciento provenían de la captura y el 31 por ciento, de la acuicultura. Este volumen procesado equivale a 2.7 millones de toneladas, destinándose un 55 por ciento para autoconsumo y un 45 por ciento para su comercialización en los mercados mundiales, con un valor de \$7,845 millones de dólares americanos

(<http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas/perspectivas%20camaron%202003.pdf>). De esta producción, el 73 por ciento es realizada por países asiáticos, el 14 por ciento es producido en América y el 13 por ciento restante lo componen países de altas latitudes como Islandia, Groenlandia y Noruega con camarones de aguas frías

(<http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas/perspectivas%20camaron%202003.pdf>).

En ese mismo año, la producción nacional de camarón en México fue estimada en 112500 toneladas, de la cual, un 63 por ciento se dio por captura y el 37 por ciento

restante por acuicultura. Actualmente México es el sexto productor mundial de camarones, produciéndose 53000 toneladas anuales por acuicultura, con un valor de \$202 millones de dólares americanos, además de una captura anual de 73000 toneladas (<http://www.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=20725>).

Debido a su alta demanda, el camarón es el principal recurso pesquero que México exporta hacia otros países desarrollados como E.U.A. y Japón, representando un 61.4 por ciento de la exportación de productos acuícolas (www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas/perspectivas%20camaron%202003.pdf ; <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/noticias/optimizan-investigadores-la-produccion-de-camaron/>).

Durante el periodo enero-marzo del 2005, E.U.A. importó un total de 112,400 toneladas de camarón. Mientras que en 1996, el consumo per cápita de camarón en México era de 280 gr., para el año 2002 esta cifra aumentó a 619 gr., pasando de 60 mil ton en 2001 a un estimado de 65 mil ton en 2002 (<http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas/perspectivas%20camaron%202003.pdf>; http://www.infopesca.org/rep_men_fish/camaron/camaron062005.pdf; <http://www.cideiber.com/infopaises/Mexico/Mexico-04-04.html>).

El camarón blanco es una especie nativa del oeste del pacífico, y su distribución va desde el Golfo de California, México, hasta las costas del Perú. Esta especie tiene la particularidad de presentar un rápido crecimiento y tolerar altas densidades, además de soportar un amplio rango de salinidad, por lo que es altamente adaptable a diferentes formas de cultivo, siendo éstas algunas de las razones de que sea ampliamente utilizada por los acuicultores de la región noroeste del país (<http://cinvestav.mx/publicaciones/avayper/julsep05/salud.pdf>; <http://www.cienciaytecnologia.yucatan.gob.mx/noticias/verarticulo.php?IdArticulo=128>).

Esta región se encuentra integrada por los estados de Baja California, Baja California norte, Sonora, Sinaloa y Nayarit que en 1998 aportaron el 66.5 por ciento del valor total generado por la acuicultura nacional, siendo este de \$1,181 millones. El aporte de Sonora fue de 33.7 por ciento del valor generado por el noroeste en esta

especialidad. Los municipios del estado de Sonora donde hay producción de camarón son: Bacum, Cajeme, Etchojoa, Guaymas, Hermosillo, Huatabampo, Puerto Peñasco, San Ignacio Río Muerto y San Luis Río Colorado, con un total de 65 unidades de producción hasta 1998 (SEMARNAP, 1998).

2.2.- Alérgenos y Reacciones Alérgicas de Origen Alimentario.

Según Abbas *et al.* (2001), se puede definir un antígeno como cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de la célula T. Hoy en día se sabe que prácticamente cualquier clase de molécula biológica, incluyendo metabolitos intermediarios, azúcares, lípidos, autacoides y hormonas, así como macromoléculas del tipo de hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, pueden servir de antígenos. Sin embargo, sólo las macromoléculas pueden iniciar la actividad linfocitaria necesaria para una respuesta de anticuerpos.

De esta manera, es posible que alguna macromolécula presente en los alimentos que habitualmente ingerimos actúe como un alérgeno, el cual puede ser definido como un antígeno capaz de producir una reacción alérgica por la inducción de síntesis de IgE.

La forma en que el organismo se puede defender de estas sustancias extrañas, incluyendo infecciones, es mediante su sistema inmunológico, el cual actúa generando respuestas inmunológicas específicas y no específicas. La síntesis de las inmunoglobulinas, las cuales pueden ser IgG, IgA, IgD, IgE, e IgM, es mediada por los linfocitos B, que son células componentes del sistema inmunológico (Roitt y Delves, 2003). Estos anticuerpos u inmunoglobulinas se unen a antígenos específicos formando un complejo antígeno-anticuerpo, contribuyendo así a su eliminación.

Particularmente la síntesis de IgE está regulada por la herencia, la exposición al antígeno, la naturaleza del antígeno y las citoquinas de las células T. La eliminación del antígeno se debe a la unión de éste con la IgE y con su receptor de alta afinidad Fc γ RI, encontrado sobre los mastocitos, los cuales son generados en la médula ósea. Como consecuencia a este proceso de entrecruzamiento del complejo IgE/Fc γ RI por el antígeno, se produce una respuesta vascular e inflamatoria denominada hipersensibilidad inmediata, causada por la degranulación de los mastocitos, los cuales liberan sustancias como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, observándose algunos síntomas como fiebre de heno y asma (Abbas *et al.*, 2001; Roitt y Delves, 2003).

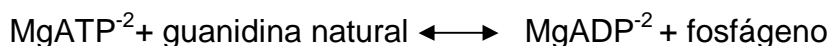
Frecuentemente los alimentos de origen marino son causa de reacciones alérgicas en humanos. Uno de los primeros en ser analizados fue el alérgeno Gad c 1, del bacalao (*Gadus callarias*), el cual pertenece a un grupo de proteínas musculares llamadas parvalbúminas (Lehrer y Reese, 2001; Aalberse, 1997; Lehrer *et al.*, 1992).

A su vez, los crustáceos son unos de los principales alimentos que usualmente inducen la producción de IgE, habiendo sido identificadas varias proteínas alérgicas homólogas a tropomiosina en diferentes especies de camarón como: Pen-a1 en *Penaeus aztecus* (Daul *et al.*, 1994), Pen-i1b en *P. indicus* y Met-e1 en *Metapenaeus ensis*. Además, Yu *et al.* (2003), identificaron al alérgeno Pen-m2 de *Penaeus monodon*, con una secuencia similar a la de arginina cinasa.

2.3.- Enzimas Fosfo-cinasas.

Las fosfocinasas son enzimas que catalizan la transferencia reversible de grupos fosforilados de alta energía como el ATP a compuestos que contienen guanidina, como la creatina, glycosiamina, taurociamina y arginina, por lo que tienen un papel

clave en la producción y uso de energía en los animales. En la siguiente reacción la guanidina fosforilada es referida como fosfágeno:



Según Suzuki *et al.* (1997), el único fosfágeno en vertebrados es la fosfocreatina, y la correspondiente fosfocinasa es la creatina cinasa (CK) por sus siglas en ingles. Tres tipos de isoformas son encontradas: M-CK, B-CK y Mi-CK, estando presentes en el músculo, cerebro y mitocondrias, respectivamente. En invertebrados al menos se encuentran seis tipos únicos de fosfágenos (fosfoarginina, fosfoglicosiamina, fosfotaurociamina, fosfolombricina, fosfohipotaurociamina y fosfo-ofelina) y con ello también han sido identificadas las correspondiente cinasas para las primeras cuatro, arginina cinasa (AK), glicosiamina cinasa (GK), taurociamina cinasa y lombricina cinasa. De igual manera, Strong y Ellington (1993), han reportado diferentes isoformas de AK en artrópodos.

La similitud entre las diferentes secuencias de aminoácidos en las fosfocinasas sugiere que han evolucionado de un origen común y, aunque la AK es la más ampliamente distribuida entre los invertebrados, no necesariamente significa que es la más ancestral (Suzuki *et.al.*, 1997).

2.3.1.- Estructura de Arginina Cinasa.

Yao *et.al.* (2005), reportaron una masa molecular de AK de camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*) de 40129.73 Da codificados en 1184 pb del cDNA clonado. A su vez, Yu *et.al.* (2003), reportaron una secuencia de cDNA de AK de camarón café (*Penaeus monodon*) codificando para un tamaño de 356-aa, con un Ala en el extremo N-terminal.

Según estudios realizados por Zhou *et al.* (1998), la estructura molecular de arginina cinasa (EC 2.7.3.3) (Figura 1) de cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), está conformada en su dominio N-terminal por una pequeña alfa-hélice seguida por un dominio C-terminal más largo (residuos 112-357). El plegamiento de AK también contiene 8 β -plegados antiparalelos, flanqueados por 7 alfa-hélices. Además durante el estado de transición (actividad enzimática) se ha confirmado un ángulo de torsión ADP glicosídico de 46° y una coordinación octaédrica del Mg^{2+} , el cual se encuentra unido por enlaces sencillos con los oxígenos de los fosfatos alfa, beta y gama.

Zhou *et al.* (1998), también revelaron información sobre la estructura y composición de la región que conforma el sitio activo de arginina cinasa del cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*). Su estudio indicó que en el momento de transición, las posiciones de los reactantes son únicamente condicionadas por las interacciones naturales con la enzima. Los grupos fosforilados del ATP son estabilizados mediante enlaces con el Mg^{2+} y cinco argininas (Arg) en las posiciones 124, 126, 229, 280 y 309 de la secuencia polipeptídica. Además encontraron que los dos glutamatos (Glu) en las posiciones 225 y 314, estabilizan a la guanidina del sustrato (Figura 2). Igualmente, señalan la existencia de interacciones entre los grupos amino y carboxilo del sustrato con los residuos lazos (63-68) de la enzima y proponen que la cisteína en la posición 271 puede aumentar la actividad catalítica de la misma.

2.3.2.- Función Metabólica de Arginina Cinasa en Crustáceos.

En los crustáceos, la arginino cinasa cataliza la transfosforilación reversible magnesio-dependiente entre arginina fosfato (PArg) y el ATP, resultando en una regeneración de este último durante el aumento de la actividad celular. La reacción se muestra a continuación:

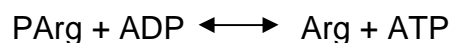




Figura 1. Estructura de arginina cinasa durante su actividad enzimática. El dominio N-terminal es mostrado en amarillo y el C-terminal en verde. Dos lazos (63-68, rojo; y 309-318, azul). Los reactantes son mostrados en forma de esferas y varas y el cofactor Mg^{2+} es representado en color azul claro.
Fuente: Zhou *et al.*, 1998.

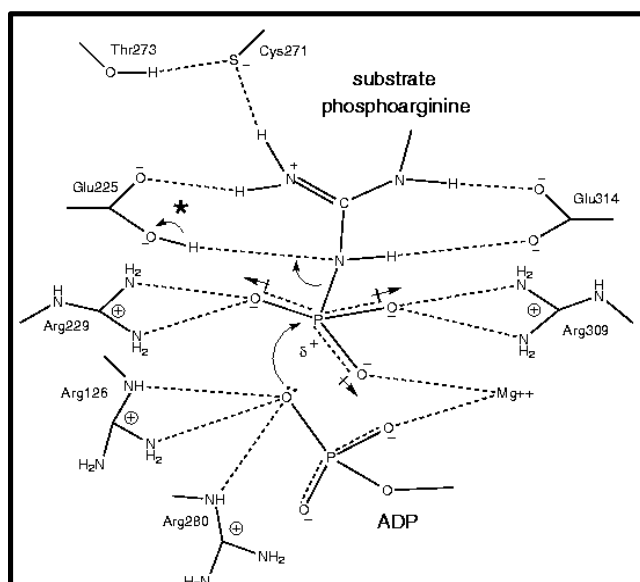


Figura 2. Representación del sitio activo de AK y su interacción con el sustrato
Fuente: Zhou *et al.*, 1998.

2.4.- Genética y Biología Molecular. Ácidos Nucleicos.

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es la molécula de la herencia en todos los organismos procariotes y eucariotes. Su estructura consiste en dos largas cadenas helicoidales enrolladas en un eje en común, formadas por desoxirribonucleótidos, cada uno de ellos compuesto por una base, un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato. A su vez, el DNA está conformado por genes que codifican las clases de proteína que sintetizarán las células, es decir, cada uno de ellos representa una cadena polipeptídica concreta, establece la sucesión de aminoácidos y contiene toda la información necesaria para la estructura y/o actividad de la proteína a sintetizar.

La expresión genética es el proceso por el cual se sintetiza una proteína a partir de la información contenida en el DNA. La expresión genética sucede en dos fases: transcripción y traducción. La transcripción genera un RNA de hebra única que es idéntica a una de las hebras del DNA doble. En este proceso se generan tres clases principales de RNA: mensajero, de transferencia y ribosomal. La traducción convierte la secuencia de nucleótidos del RNA en la secuencia de aminoácidos que forman una proteína. El molde directo para la síntesis de proteínas es el ácido ribonucleico mensajero (RNAm), pues es el intermediario encargado de transportar la información transcrita del núcleo hacia el citoplasma para la traducción y síntesis de proteínas (Stryer, 1988; Lewin, 2001).

El avance tecnológico alcanzado a fines del siglo pasado en el campo de la biología ha dado lugar a que la Biología Molecular sea parte muy importante en la gran mayoría de las investigaciones de punta (<http://www.fcen.uba.ar/publicac/revexact/exacta9/institu1.htm>). Un ejemplo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que en la actualidad es una técnica universalmente utilizada para amplificar un fragmento de DNA mediante el uso de la Taq DNA polimerasa e iniciadores en ambos sentidos ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$) (Campbell, 1996).

Una vez que el fragmento requerido ha sido amplificado se puede clonar en un vector de clonación o de expresión, los cuales se caracterizan por tener múltiples sitios de corte para enzimas de restricción, además de poseer marcadores de resistencia a antibióticos como ampicilina y/o kanamicina, que después de la transformación permiten la selección de las colonias bacterianas que utilizan el plásmido del vector. Un ejemplo es el vector de expresión pET-11a, que contiene al promotor T7 y sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI*, entre otros elementos (Figura 3).

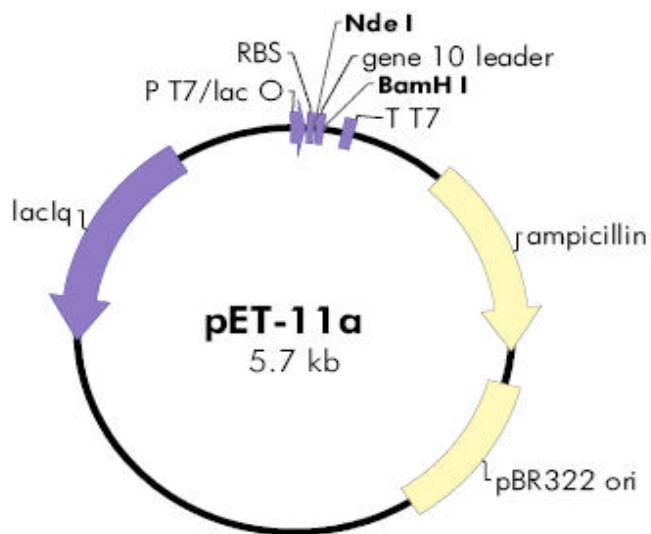
2.4.1.- Bancos de genes

En general, las proteínas que poseen una secuencia similar entre sí (>35% de identidad) presentan además un plegamiento y funciones parecidas. Siendo así, se dice que ambas proteínas son homólogas y muy posiblemente provienen de un mismo gen ancestral (Webster, 2000).

En la actualidad, es posible conocer la relación de homología existente entre una o más secuencias de genes de la misma o diferentes especies y todo lo que se necesita es tener una computadora con acceso a Internet. Esto se debe a la existencia de varias aplicaciones a las que podemos acceder mediante la World Wide Web (WWW), en donde se encuentran bases de datos de secuencias, programas de alineación y herramientas para la búsqueda de bases de datos que son disponibles de manera gratuita (Webster, 2000).

Una de las herramientas encontradas en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), con dirección en Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> es la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST, por sus siglas en inglés). Este programa compara secuencias de nucleótidos y proteínas contra secuencias de las bases de datos y calcula la significancia estadística de las

Promotor T7 con operón *lac* 1-43
sitio de enlace al ribosoma (RBS) 74-80
sitio de clonación *Nde*I 86-91
sitio de clonación *Bam*HI 125-130
terminador T7 199-245
región de resistencia a ampicilina 657-1514
origen de pBR322 1665-2332
represor *lac*^q 4212-5168



Sitio de clonación en pET-11a
secuencia mostrada (74-130)

	Nde I		Nhe I										BamHI		
GAAGGAGATATACAT		ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGC	GGA	TCC
		M	A	S	M	T	G	G	Q	Q	M	G	R	G	S
		T7 gene 10 leader peptide													

RBS: GAAGGAGATATACAT
 START: ATG

Figura 3. Mapa de los elementos del vector de expresión pET-11a y secuencia de la región de clonación del producto de PCR.

Fuente: http://www.genomex.com/vector_maps/pET-11a_map.pdf.

concordancias. BLAST puede ser usado para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre las secuencias, así como ayudar en la identificación de miembros de familias de genes (NCBI, 2006).

Otra herramienta útil para la comparación de secuencias de nucleótidos y proteínas es el programa CLUSTALW, el cual puede ser adquirido en la dirección de Internet <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. La ventaja de este programa es que permite alinear varias secuencias a la vez (Instituto Europeo de Bioinformática, 2006).

Un uso muy importante de todas estas herramientas es que pueden diseñarse oligonucleótidos basándose en las secuencias depositadas en estas bases de datos.

2.5.- Bioquímica de Proteínas.

Mediante el estudio de las proteínas, podemos entender cómo es que éstas desempeñan funciones tan diversas en la naturaleza y en los seres vivos, así como las características que les confieren sus propiedades particulares.

Boyer (1986), indica que los detalles moleculares de un proceso bioquímico no pueden ser completamente comprendidos hasta que las moléculas que intervienen en él son aisladas y caracterizadas. De igual manera Stryer (1988), señaló que un paso indispensable en estos estudios es la purificación de la proteína de interés. Una vez pura, es posible deducir la secuencia de sus aminoácidos y su estructura conformacional. Además, Branden y Tooze (1991) y Boyer (1986), mencionaron que los aminoácidos también determinan la función biológica de éstas.

La secuencia lineal de aminoácidos forma la estructura primaria de una proteína. Cuando dos diferentes proteínas tienen una alta similitud en su estructura primaria, se dice que son homólogas entre sí y se presume que ambas han evolucionado a

partir de un gen ancestral común. La estructura secundaria está formada por α -hélices y/o laminas- β que al plegarse forman estructuras globulares llamadas dominios, las cuales se pueden unir entre sí para constituir la estructura terciaria de las proteínas. La asociación de varias de estas cadenas polipeptídicas idénticas origina una proteína multimérica, formando así una estructura cuaternaria, en la que frecuentemente podemos encontrar un sitio activo, gracias a la adhesión de un cofactor o coenzima (Branden y Tooze, 1991).

Stryer (1988) también mencionó que tres de las técnicas clave para analizar y purificar a las proteínas son: electroforesis, ultracentrifugación y cromatografía.

2.5.1.- Cromatografía

Cromatografía es un término introducido por Mikhail Tswett en 1906 para describir la separación de una mezcla de pigmentos por una columna de carbonato de calcio. Este se deriva del griego *Chroma*, color, y *graphein*, dibujar (Boyer, 1986).

En la actualidad la cromatografía es una de las técnicas más efectivas para la separación y purificación de toda clase de biomoléculas (Boyer, 1986). Existen diferentes tipos de cromatografía; sin embargo, todos los métodos están basados en un principio muy simple. La muestra a ser examinada interactúa con dos entidades físicas distintas; una fase móvil y una estacionaria. La fase móvil, que puede ser gaseosa o líquida, mueve a la muestra a través de una región que contiene a la fase estacionaria sólida o líquida, la cual tiene la habilidad de enlazar o retener algunos tipos de solutos (Boyer, 1986).

La muestra que contiene diferentes componentes entra en contacto con la fase estacionaria. Los componentes con mayor afinidad a esta fase tardarán más en recorrer la columna cromatográfica, en cambio las moléculas que muestren una

afinidad débil a la fase estacionaria serán más rápidamente eluidas. La fase móvil puede ser recolectada en función del tiempo en diferentes fracciones que contendrán los distintos componentes de la muestra original (Boyer, 1986).

2.5.1.1.- Intercambio iónico.

En este tipo de cromatografía los solutos iónicos presentan interacciones electrostáticas reversibles con la fase estacionaria cargada, la cual es empacada en una columna. Esta fase consiste en una resina sintética cargada con grupos iónicos funcionales, confiriéndole una carga neta. La fase móvil conteniendo las moléculas de interés, que pueden estar cargados de forma positiva, negativa o neutral, entra a la columna. Las moléculas que tienen una carga opuesta a la de la resina se enlazarán estrechamente a la fase estacionaria, mientras que las que tengan una carga neutral o igual a esta, se moverán junto con el buffer de elusión. Las moléculas enlazadas a la matriz o resina pueden ser liberadas eluyendo la columna con un buffer de mayor fuerza iónica o pH (Boyer, 1986). Según Amersham Biosciences (2002), la Q-sepharose es un potente intercambiador aniónico pues se encuentra cargado positivamente.

La separación de las proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico es posible debido a la particular carga iónica que nuestra proteína de interés posee. Así mismo, la carga neta de una proteína depende de su contenido de aminoácidos, ya que éstos pueden ser ácidos o básicos dependiendo de sus grupos funcionales. Además, si la molécula es anfótera, como la mayoría de las proteínas, la carga neta depende del pH del medio en donde se encuentra.

El punto isoeléctrico (pI) es otro factor que influye en la carga neta de nuestra proteína. A valores de pH por debajo del pI, la carga neta de la proteína es positiva, debido a que los grupos ionizables de sus aminoácidos están protonados. En cambio

a valores de pH por encima del pI , la carga neta es negativa (Boyer, 1986). Yao *et al.* (2005) reportaron el punto isoeléctrico de AK del camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*) de 5.92. Mientras que Anosike (1975) reportó una actividad enzimática para AK de langosta (*Homarus vulgaris*) arriba del 75% cuando se encontraba en un rango de pH 7.0-9.2 y de 100% a un pH 8.6. Debido al pI y rango de estabilidad de pH presentados para AK, la matriz óptima es un intercambiador de aniones.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Obtención del cDNA.

3.1.1.- Diseño de Oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para arginino cinasa en base a la secuencia de arginino cinasa de *Penaeus monodon* depositada en el GenBank. El oligo en dirección sentido (Fw AK), contiene a la metionina inicial (ATG), además del sitio de restricción *NdeI* (CATATG). Los otros oligos FwIAk y RvIAk internos fueron utilizados para realizar PCR anidados.

Para obtener el extremo 3' del cDNA de la proteína se diseñaron oligonucleotidos basándose en la secuencia nucleotídica del vector en el cual se construyó el banco de genes de músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (elaborado por la Dra. Gloria Yépez), incluyéndose el sitio de restricción *BamHI* (GGATCC).

En la Figura 4 se describe la estrategia de localización de los oligonucleotidos diseñados con el objetivo de obtener el cDNA completo de AK, además de la posición de los iniciadores internos.

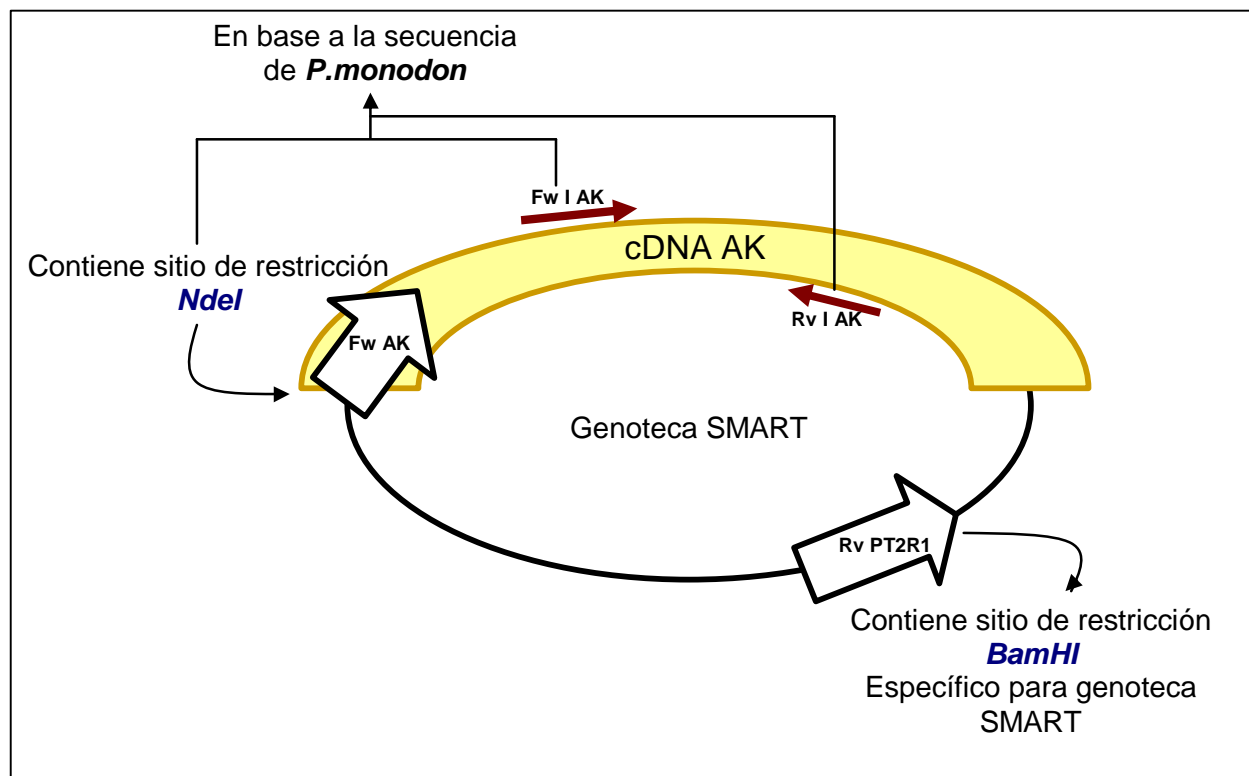


Figura 4. Localización en la genoteca SMART de los iniciadores diseñados.

3.1.2.- Amplificación del gen de arginina cinasa.

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando como templado la genoteca SMART de músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), ya que ésta contiene los genes obtenidos a partir de los mensajes de RNA. Se realizaron cuatro reacciones. El objetivo de las reacciones 1 y 2 era la amplificación del gen de AK usando distintos oligonucleótidos antisentido, las otras reacciones fueron los controles positivo y negativo. Para la amplificación se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). La amplificación se realizó en un termociclador DNA ENGINE PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA) bajo las condiciones descritas en la Figura 5, esperando un fragmento de aproximadamente 1000 pb. Las mezclas de reacción para la amplificación del gen se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar el cDNA de AK.

Componente	Rxn	Rxn	Ctrl	Ctrl –
	1	2	+	
Buffer 10 x	5	5	5	5
MgCl 25 mM	3	3	3	3
Fw AK <i>NdeI</i> 10 mM	2	2	-----	-----
Rv CDS III <i>BamI</i> 10 mM	2	-----	-----	-----
Rv PT2R1 <i>Bam HI</i> 10 mM	-----	2	-----	-----
Fw I Ak 10 mM	-----	-----	2	2
Rv I Ak 10 mM	-----	-----	2	2
dNTP 10 mM	5	5	5	5
Templado; Genoteca SmarT (músculo de camarón)	2	2	2	-----
Taq polimerasa comercial	.5	.5	.5	.5
H2O Milli Q estéril	30.5	30.5	30.5	32.5
Vol. Total	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

	<u>Temperatura °C</u>	<u>Tiempo min</u>
32 ciclos	94	3
	94	1
	65	1
	72	3
	72	10
	4	indefinidamente

Figura 5. Condiciones de amplificación por PCR del gen AK.

3.1.3.- Electroforesis en Gel de Agarosa.

Con el objetivo de observar los fragmentos amplificados por PCR, las reacciones se sometieron a electroforesis. Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM) al cual se le añadieron .04µl/ml de bromuro de etidio. Las muestras se mezclaron con buffer de carga (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25% y de xilén-cianol 0.25%) y se inyectaron en el gel, el cual se sometió a 70 V constantes en una cámara de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA) con buffer TAE 1X.

El gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta Gibco BRL y se fotografió con un fotodocumentador digital Kodak EDAS 120.

3.1.4.- Purificación y Cuantificación de DNA.

Los productos de PCR (amplicones) obtenidos se purificaron mediante columnas GFX (Pharmacia) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se cuantificaron mediante la relación 260/280 utilizando un espectrofotómetro CARY 50 Bio. Se utilizó la ecuación:

$$[\text{DNA}] = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{fd}}{1000}$$

($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Donde:

A_{260} = Absorbancia a 260.

fd= Factor de dilución.

3.1.5.- Clonación de los Amplicones en el Vector de Expresión pET-11a.

3.1.5.1.- Digestión del gen con enzimas de restricción.

Los amplicones limpios y cuantificados se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI* (Tabla 2), en el orden señalado. Los amplicones limpios se concentraron a vacío en un DNA speed vac (Savant), hasta un volumen de 10 μl y se digirieron con *BamHI*. La reacción se incubó por dos horas a 37° C. Posteriormente se limpió nuevamente por GFX y se concentró a 10 μl . Después se procedió a digerir

los mismos amplicones con *NdeI* bajo las mismas condiciones de la digestión anterior. La reacción se purificó por GFX y se concentró a 1 μ l.

Tabla 2. Composición de las reacciones para la digestión con enzimas de restricción.

COMPONENTE	<i>BamHI</i> (μl)	<i>NdeI</i> (μl)
H ₂ O Milli Q estéril	2.35	2.5
Buffer	1.5	1.5
DNA	10	10
Enzima	1	1
Albúmina sérica bovina (BSA)	.15	---
Vol. total	15	15

3.1.5.2.- Ligación en vector de expresión.

El amplicón con los sitios de restricción *BamHI* y *NdeI* se ligó al vector de expresión pET-11a, el cual fue proporcionado previamente digerido con las mismas enzimas de restricción por el M.C. Enrique de la Re Vega. Las cantidades de los reactivos a utilizar se establecieron mediante la relación óptima vector:inserto de 1:3. La reacción de ligación se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Su composición se detalla en la Tabla 3.

Para corroborar la ligación del inserto en el plásmido, se realizó una reacción de PCR (Tabla 4) usando como templado la reacción de ligación descrita en la Tabla 3. Los oligonucleótidos usados fueron: Fw AK y T7 terminador, este último es específico para el vector pET-11a, y se encuentra al final del sitio múltiple de clonación.

Tabla 3. Composición de la reacción de ligación al vector pET-11a

COMPONENTE	µl
H ₂ O Milli Q estéril	3
Buffer	2
Inserto DNA	1
Vector	3
T4 DNA ligasa	1
Vol. total	10 µl

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de PCR para corroborar la ligación del inserto al vector pET-11a.

COMPONENTE	Rxn1 (µl)	Ctrl - (µl)
Buffer 10X	2.5	2.5
MgCl 50mM	1.5	1.5
Fw AK	1	1
T7 terminador	1	1
dNTP's	2.5	2.5
Reacción de ligación	1	---
Taq. Polimerasa	.25	.25
H2O Milli Q estéril	15.25	16.25

3.1.5.3.- Transformación en *E.coli*

Con la construcción obtenida se transformaron bacterias *E.coli* químicamente competentes One Shot[®] TOP 10 (Invitrogen). A 50µl de bacterias se le añadió 8 µl de la reacción de ligación. La mezcla se mantuvo en hielo por 10 min. y posteriormente se le aplicó un choque térmico (42°C) durante 30 seg., y se colocó en hielo

nuevamente por 10 min. Para estabilizar a las células se le añadió a la mezcla 250 μ l de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, tristona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó por una hora a 37°C en un agitador.

Las células transformadas se extendieron en placas con medio LB (triptona 2%, extracto de levadura 1%, NaCl 1% y agar 3%) conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron 20 colonias de las placas y se analizó la presencia del gen de AK mediante PCR utilizando los oligonucleótidos T7 promotor y T7 terminador del vector.

Para realizar el PCR de colonias (Tabla 5), éstas se picaron con un palillo de madera estéril y se resembró en una placa con medio LB + ampicilina (100 μ g/ml). El mismo palillo se agitó en 75 μ l de agua Milli Q estéril, para suspender a las células y utilizarlo como templado.

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción de PCR de colonias.

COMPONENTE	Reacciones	Controles	
	(μ l)	(+)	(-)
	1 - 20		
Buffer 10x	2.5	2.5	2.5
MgCl 50mM	1.5	1.5	1.5
T7	1	----	----
T7 terminador	1	----	----
Fw I Arg	----	1	1
Rv I Ark	----	1	1
dNTP's	2.5	2.5	2.5
Colonia transformada	3	----	----
Genoteca Smart	----	1	----
Taq DNA polimerasa	.25	.25	.25
H ₂ O Milli Q estéril	11.25	13.25	14.25
Vol. Total	23	23	23

3.1.5.4.- Aislamiento de DNA plasmídico.

Se utilizó el método modificado de lisis alcalina de Sambrook *et al.* (1989). Las colonias que presentaron el inserto con tamaño esperado (aproximadamente 1000 pb) se cultivaron en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm).

Se transfirieron 1.5 ml del cultivo a un microtubo y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y se resuspendieron las células en 250 µl de buffer (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, pH 8). A la suspensión se le agregó 250 µl de una mezcla de lisis (SDS 1%, NaOH .2 N). La suspensión se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min. Posteriormente se le añadió 250 µl de buffer de neutralización (60 ml acetato de potasio 5M, ácido acético glacial 11.5 ml, agua 28.5 ml), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min. La mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril donde se le agregó 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló en vortex. Seguido a esto, se centrifugó a 12000 x g a 4°C por 30 min.

Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó (sin agitar) con 300 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó por 30 segundos para después remover el etanol. El pellet se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en 50 µl de agua. El microtubo se almacenó a -20°C hasta su análisis de secuencia.

3.1.6.- Secuenciación.

Las muestras se enviaron a la Universidad de Arizona, E.U.A., para ser secuenciadas y comparar con las existentes en el Genbank, utilizando el algoritmo BLASTX. Por otro lado, la secuencia completa fue alineada utilizando el algoritmo CAP3.

3.2.- Purificación de Arginina Cinasa.

3.2.1.- Muestra.

Se utilizó músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* obtenido de una granja localizada en Bahía de Kino, Sonora; el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis.

3.2.2.- Extracción de la Proteína.

Se pesaron 5 g de músculo congelado y se homogenizó a 30000 rpm con 50 ml de buffer de extracción a 4°C (Tris-HCl 0.1M pH8, EDTA 1mM, NaN₃ 5?M, PMSF 25?M, 2-ME 10mM) utilizando un homogenizador (Glen Mills Co. Clifton NJ, E.U.A.). La mezcla se agitó durante 16 h a 4°C y se centrifugó a 12000 x g durante 30 min a la misma temperatura.

3.2.3.- Precipitación con Sulfato de Amonio.

El sobrenadante obtenido se ajustó a una saturación del 70% con sulfato de amonio y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se colectó el sobrenadante, el cual se llevó a 90% de saturación con sulfato de amonio y se centrifugó de nuevo a 20000 x g por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue

desechado y el pellet se resuspendió en 6ml de buffer de equilibrio (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 0.1 mM, 2-ME 10 mM).

3.2.4.- Purificación por Cromatografía de Intercambio Iónico.

Con el objetivo de disminuir la salinidad de la muestra, se utilizó una columna P-10 (Bio-Rad), la cual fue previamente equilibrada con el buffer de corrida. Primero se hicieron pasar 3 ml de la muestra, seguido de 8ml de buffer de equilibrio, los cuales fueron colectados. La solución proteica libre de sulfato de amonio fue analizada por el método de Bradford para verificar la presencia de proteína. Se repitió el procedimiento para la muestra restante.

Posteriormente, se inyectó en una columna de intercambio iónico de 7.5 ml a un flujo de 0.1ml/min, utilizando una matriz de Q-sepharose (Yu *et al.*, 2003) que previamente había sido lavada y equilibrada con buffer de equilibrio. El efluente de la columna cromatográfica se colectó en fracciones de 1.5 ml. Las proteínas no adsorbidas fueron lavadas con buffer de equilibrio, mientras que las adheridas a la matriz fueron eluidas con un gradiente lineal de 0 a 1M NaCl a un flujo de 0.2 ml/min.

Las fracciones obtenidas fueron leídas en un espectrofotómetro (Cary 50) a 280 nm y los datos derivados fueron graficados para construir un cromatograma donde se observó el comportamiento de las moléculas eluidas con respecto a la concentración salina del buffer de elusión al igual que las fracciones que contienen una concentración mayor de proteína.

3.2.5.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida .

Las muestras que resultaron con mayor concentración de proteína fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 12%, bajo condiciones desnaturizantes y reductoras, el cual fue teñido con nitrato de plata.

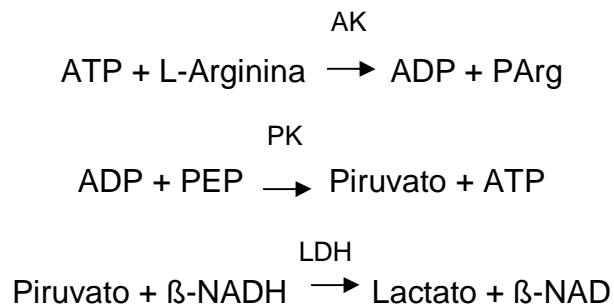
Cada muestra fue preparada añadiendo buffer carga SDS-βME 5X y calentadas a 100°C por 10 min. Posteriormente colocadas en hielo y cargadas en el gel, siendo separadas aplicando 15 mA en una cámara electroforética Miniprotean 3 (Biorad), usando buffer cámara (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%).

Las muestras con la proteína pura se dializaron contra buffer salino (NaCl 0.9%) y la concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.- Identificación de la Proteína Purificada.

3.3.1.- Actividad Enzimática de Arginina Cinasa.

La actividad enzimática de la proteína purificada, fue medida determinando la tasa de formación de ADP. El ADP se convierte nuevamente a ATP por la acción enzimática de la piruvato cinasa (PK) y el piruvato formado es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH). La tasa de oxidación de NADH fue medida espectrofotométricamente a 340 nm. Las reacciones acopladas que ocurren durante el ensayo enzimático son descritas a continuación:



Primeramente se preparo la mezcla de reacción descrita en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción para el ensayo de actividad enzimática.

COMPONENTE	(ml)
Buffer (glicina 250mM, pH 8.6)	9.75
MgSO ₄ 200mM	1.0
KCl 2M	1.0
Fosfoenolpiruvato (PEP) 300mM	1.0
ATP 200 mM	0.5
*NADH 7.5mM	0.25
Vol. total	13.5

*Se disolvió en buffer de glicina 250 mM, pH 8.6

En una celda de cuarzo, se agregaron: 1.35 ml de mezcla de reacción, 50 μ l (20 U) de las enzimas PK/LDH (SIGMA) previamente diluidas en buffer de glicina 100 mM, 2- β -Mercaptoetanol 10mM, y 50 μ l de L-arginina 500 mM, esta mezcla se monitoreo a $A_{340\text{nm}}$ a 30°C hasta que la lectura permaneció estable. Inmediatamente después se agregaron 50 μ l de la muestra (AK) y se leyó la disminución de Abs a 340nm, debido a la oxidación del NADH. Igualmente se realizo un blanco con el de buffer de la enzima (glicina 100 mM, 2-ME 10 mM) (Tabla 7).

Tabla 7. Reacción de actividad enzimática.

COMPONENTE	Rxn E	Blanco
Mezcla de reacción	1.35 ml	1.35 ml
PK/LDH 20 U (Sigma)	50µl	50µl
L-arginina 500 mM	50µl	50µl
* Proteína purificada (AK)	50µl	---
Buffer Glicina 100 mM, 2-ME 10 mM	---	50µl
Vol. final	1.5 ml	1.5 ml

*La proteína se diluyó 1:3 con buffer de glicina 100 mM, 2-ME 10 mM

Las unidades de actividad se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/ml enzima} = \frac{(? A_{340}/\text{min rxnE} - ? A_{340}/\text{min blanco}) (1.5) (fd)}{(6.22) (0.05)}$$

Donde:

1.5= Volumen total de la reacción (ml).

fd= Factor de dilución de la enzima.

6.22= Coeficiente de extinción milimolar del β -NADH a 340 nm

0.05= Volumen de la enzima usada (ml)

Las unidades por mg de proteína se calcularon mediante:

$$\text{Unidades/mg proteína} = \frac{\text{Unidades/ml enzima}}{[\text{Proteína pura (ppm)}]}$$

Una unidad de actividad convierte: 1µmol de L-arginina y ATP en fosfo-arginina y ADP, por minuto, a pH 8.6 a 30°C.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Obtención del cDNA

4.1.1- Diseño de Oligonucleótidos.

El iniciador FwAK contiene el sitio de corte específico para *NdeI* (CATATG), mientras que PT2R1 y CDIII contienen el sitio de restricción específico para *BamHI* (GGATCC), colocados en el extremo 5'. Además, antecediendo las secuencias de corte por enzimas de restricción, se añadió una secuencia de bases con el objetivo de favorecer la traducción de la proteína. La secuencia de iniciadores diseñados es mostrada en las Tablas 6 y 7.

Tabla 8. Oligonucleótidos específicos para arginina cinasa.

Oligo	Dirección	Secuencia 5' → 3'
Fw AK	sentido	<u>GGAATTCCATATG</u> GCTGACGCTGCTGTTATT
FwIAk	sentido	CAAGACCTTNCTTGTCTGG
RvIAk	antisentido	CTTGATGAGCTCAAGGATACC

Tabla 9. Oligonucleótidos de la genoteca SMART.

Oligo	Dirección	Secuencia 5' → 3'
PT2R1	antisentido	<u>CGGGATCC</u> CTCTTCGCTATTACGCCAGCTG
CDS III	antisentido	<u>CGGGATCC</u> ATTCTAGAGGCCGAGGCCGGCCGACATG

4.1.2- Amplificación del gen de arginina cinasa.

La reacción 1 fue realizada con los iniciadores FwAK y Rv CDS III, mientras que para la reacción 2 se utilizaron FwAK y Rv PT2R1. El tamaño del fragmento esperado en ambas reacciones era de aproximadamente 1000 pb. Esto en base a que Yu *et.al.* (2003) y Yao *et al.* (2005), reportaron la secuencia completa del cDNA de arginina cinasa en camarón “tigre negro” y “chino”, respectivamente, siendo ésta un poco mayor a 1000 pb en ambos casos.

En la Figura 6 se puede observar que en el carril 2, correspondiente a la reacción 1, hay una banda de aproximadamente 1500 pb, mientras que en carril tres (reacción 2) se observan tres bandas con un peso entre 1000 y 1650 pb. El control positivo (carril 4) presenta una banda del tamaño esperado (409 pb), mientras que en el control negativo (carril 5) no se observó ninguna amplificación.

En la Figura 7 se observan los resultados de las reacciones añadidas utilizando los iniciadores específicos. Como se puede observar en los carriles del 2-5 se obtuvo un fragmento de tamaño esperado de 400 pb, que nos indica que las bandas amplificadas en la reacción 2 corresponden a AK. Strong y Ellington (1993), reportaron la existencia de diferentes isoformas de AK en artrópodos, por lo que los amplicones analizados podrían ser distintas isoformas de AK en *L.vannamei*.

Con base en lo anterior se decidió utilizar la reacción 2 para clonar en el vector de expresión pET-11a y formar el constructo para transformar en la cepa *E.coli*.

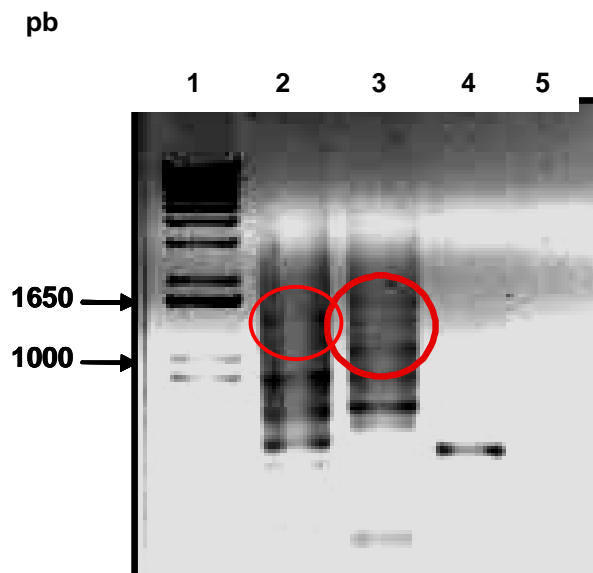


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR de AK. Carril 1: estándar de peso molecular 1Kpb Plus DNA Ladder (Invitrogen); carril 2: amplificación con iniciadores FwAK y RvCDSIII carril 3: amplificación con iniciadores FwAK y RvPT2R1; 2; carril 4: control positivo; carril 5: control negativo.

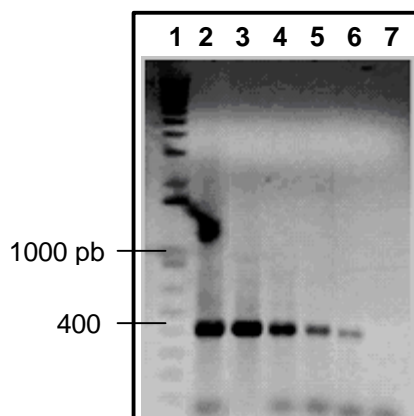


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR usando como templado bandas del peso esperado recortadas y purificadas. Carril 1: estándar de peso molecular “1Kpb Plus DNA Ladder” (Invitrogen); carril 2: amplificación por PCR usando como templado la banda purificada de aprox. 1500pb de la reacción 1; carriles 3,4 y 5: amplificación por PCR usando como templado las tres bandas purificadas de la reacción 2; carriles 6 y 7: controles positivo y negativo, respectivamente.

4.1.3.- Clonación de los Amplicones en el Vector de Expresión pET-11a.

El producto de PCR de la reacción 2 se purificó por GFX y se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI*. Posteriormente, se cuantificó la concentración de DNA, resultando ésta de 125.25 ng/μl.

Considerando una relación óptima vector:inserto (1:3) se preparó la reacción de ligación y se transformó en *E.coli* químicamente competente. Las células transformadas se transfirieron a placas con medio LB con ampicilina (100 μg/ml). Después de 24 horas de incubación a 37°C, las placas presentaron colonias blancas (Tabla 8) de las cuales se eligieron y numeraron 20 para hacer la búsqueda de clones positivos mediante la técnica de PCR de colonias.

Tabla 10. Conteo de colonias transformadas y número de colonias seleccionadas.

Placa	# colonias	Colonias seleccionadas para PCR
1	21	6
2	23	6
3	39	8

En la Figura 8 se muestra el gel de agarosa al 1 % donde se analizaron los PCR de las 20 colonias seleccionadas, se observa que los clones poseen insertos de distintos tamaños lo cual se debe a que en la reacción de PCR utilizada en la ligación había más de un amplicón; sin embargo, los clones 19 y 20 presentaron el tamaño de inserto (1650 pb) más aproximado al cDNA completo de AK (1071 pb en *P.monodon*) de otras especies de camarón. Se realizó la extracción y limpieza de plasmídico para su posterior secuenciación.

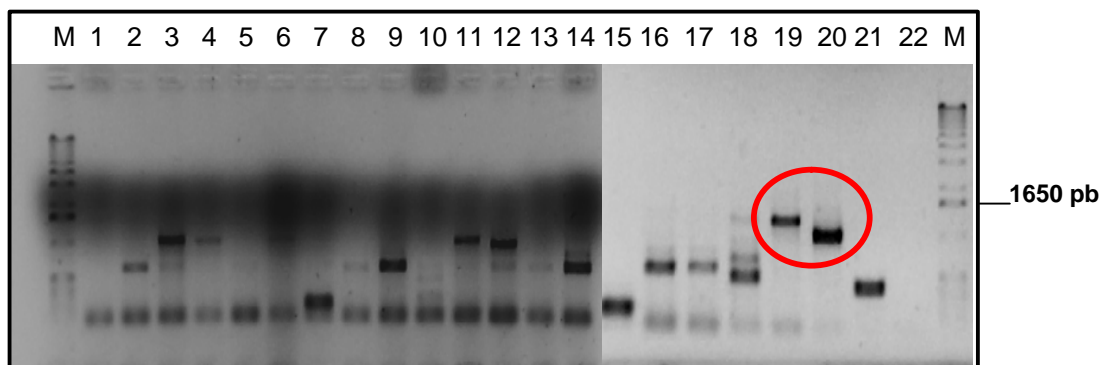


Figura 8. Análisis electroforético de los productos de la amplificación por PCR de colonias. Carril M: estándar de peso molecular 1Kpb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Carriles 1-20: amplificación por PCR de colonias; carriles 21 y 22: controles positivo y negativo respectivamente.

4.1.4.- Secuenciación.

El DNA plasmídico de los clones 19 y 20, con los insertos de AK, fue purificado mediante columnas GFX y secuenciado en la Universidad de Arizona, E.U.A.

Con la secuencia de nucleótidos obtenida de ambas colonias, se determinó la secuencia completa del cDNA de arginina cinasa de camaron blanco (*Litopenaeus vannamei*) con un tamaño de 1425 pb, a partir de la cual se dedujo una secuencia de 356 aminoácidos. Ambas secuencias son mostradas en la figura 9.

```

1                                     M A
1  CTGCGATCCTGAGT CGAGGAGGT GTTAGGACGCCAGGAATCTTCAAGCAA CAAAATGGCT
3  D A A V I E X L E A G F K X L E A A T D
51  GACCGCTGCTGTTATTGAGAAGCTGGAGGCTGGTTTCAGGAAGCTTGAAGCCGCCACCGAC
23  C X S L L K X Y L T X I V F D K L X D X
121  TGCAAAGTCTCTCCTTAAGAAGTATCTTACTAAGGAAGTCTTCGACAAAGCTCAAGGACAAAG
43  R T S L G A T L L D V I Q S G V E N L D
181  AGGACCTCCCTGGGAGCCACCCCTCCTCGACGT CATCCAATCCGGTGT GGA GAACCTGGAC
63  S G V G I Y A F D A I A Y T L F A F L F
241  TCTGGTGTGGTATCTATGCTCCCGACGCCGAGGCCCTACACCCTCTTCGCTCCCTCTTC
83  D F I I E D Y E V G F K Q T D X E F N X
301  GACCCCATCATCGAAGGACTACCAATGTTGGCTTCAAGCA GACC GACAA GCA CCCC AA CAAAG
103  D F G D V N S F V N V D F I G K F V I S
361  GACTTCGGT GATGT GAAC TCTT CGTGAACGT TGACCCCGAGGGCAA GTTCGTTATCTCC
123  T R V R C G R S L Q G Y F F N F C L T I
421  ACCCGCGTCCGCTGCGGTCCGCTCCTTGCAAGGTTACCCCTTCAACCCCTGCGCTCACTGAG
143  S Q Y X E M I A K V S S T L S S L I G I
481  TCTCAGTACAAAGGAGATGGAGGCCGAAGGT TTCCTCTACCTT TCTAGCTT GAGGGGCGAG
163  L K G T Y Y F L T G M S K I V Q Q K L I
541  CTCAAAGGATACCTACTACCCTCACTGGCATGAGCAAGGAAGTCCA GCA GAAGCTGATC
183  D D E F L F X I G D R F L Q A A N A C E
601  GACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAACGCTTCTGACAGGCCGC CAACGCTTGCCGC
203  Y W F A G R G I Y E N D N X T F L V W V
661  TACTGGCCCGCCGGCCGTTGCATCTACCAACAACGACAA CAAGACCTTCTTGTCTGGGTC
223  N I I D E L R I I S M Q W G G D L G Q V
721  AACGAGGAGGATCACTCCGCATCATCTCCATGCAGATGGGC GGTTGCTCGGCCAGGTC
243  F R R L T S A V N E I I E K R I F F S B B
781  TTCCGCCGCCCTCACCTCCGCTGTGAACGAGAT TGA AAAA GAGGATTCCCTTCTCTCAACC
263  D R L G F L T F C F T N L G T T V R A S
841  GACCGCCTGGGCTTCTCTCACTTTCTGCCCCACCAACCTTGGCAACCACTGTGGCCGCCTCC
283  V E I K L F X L A A N R E X L E E V A G
901  GTCCACATCAAGCTGCCCAAGCTTGCCGCTAAACCGCGA GAAGCTTGAAGA GGTCCGCTGGC
303  K Y N L Q V R G T R G I E T I A E G G I
961  AAGTACAACCTGCAAGGTGC GCGG CACCCGCGGTGAGCA CACTGAGGC TGA GGGCCGCATC
323  Y D I S N K R R W G L T E F Q A V X I M
1021  TACGATATCTCCAA CAAGC GCCG CATGGG TCTGACTGA GTTC CAGGC TGT CAAGGA GATG
343  Q D G I L E L I K I E K E M *
1081  CAGGAACGATATCCTTGAGCTCATCAAGAT TGA GAAGGA GATGT AAGC TTA CTTTTA GTTA
1141  CTACAGTCAATCCCGGCTCTCAA CCCCCTATGGGTGGGGGGCGAGCTG GTT TTA ACTGTGG
1201  CGGTGTAGGAGGAGGGATCGCCCTTAGCCATGGGCTTAGATCCTAAC GGA TGAAGTCCAA
1261  GGAGAAGGGCGTACCGGATGGAGTGAGTCACCAACTGTGTGAAGCTCCGGTAACA TTCC
1321  AGGCTACCCGGAGCTTTGGGGGGCGACAACTGTAAATA CCAC CACGTACA TGATTGGTAA
1381  TGCTACCCCGACATCTATATATCNCNAAAA AAA AAAAAA AAAAAA

```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pET-11a/AK. M: metionina inicial; *: codón de terminación.

4.2.- Purificación de AK.

4.2.1.- Extracción y Precipitación de la Proteína.

Después de homogenizar el músculo de camarón y realizar la extracción, se obtuvo un extracto crudo en el cual se encontraron una gran cantidad de proteínas de distintos tamaños. Después de la primera centrifugación se observó que la eliminación de proteínas de la mezcla, fue mínima. Sin embargo, después de la saturación de la solución proteica con sulfato de amonio al 70 y 90%, se observó una considerable disminución de proteínas en la muestra como se observa en la Figura 10.

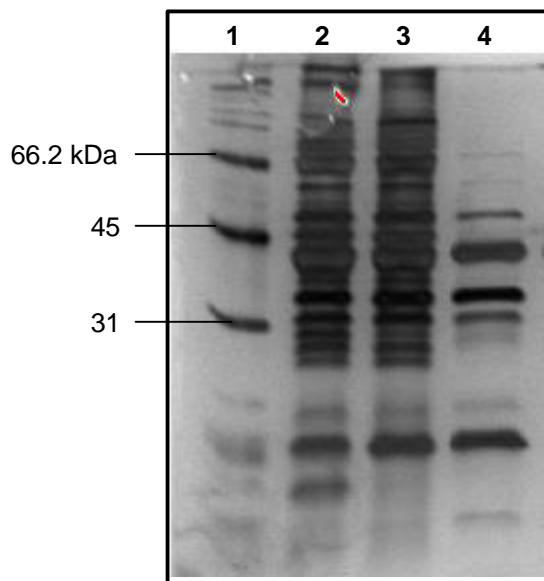


Figura 10. SDS-PAGE. Carril 1: Estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); carril 2; extracto crudo del músculo de camarón blanco; carril 3; sobrenadante después de centrifugar el extracto crudo; carril 4: clarificado al 90% con sulfato de amonio.

4.2.2.- Cromatografía de Intercambio Iónico.

Posteriormente se hizo pasar la muestra por la columna cromatográfica de intercambio iónico en donde las proteínas lavadas con el buffer de equilibrio corresponden a las fracciones 1-29. El gradiente lineal con NaCl fue aplicado a partir de la fracción 30, observándose una mayor concentración de proteína eluida en las fracciones 31,32 y 33.

La concentración de las fracciones se determinó usando el espectrofotómetro (Cary 50 bio) A_{280} y fueron graficadas. En el cromatograma (Figura 11) se observó que la mayor cantidad de proteína se colectó en la fracción 32 a una concentración aproximada de NaCl 0.13 M.

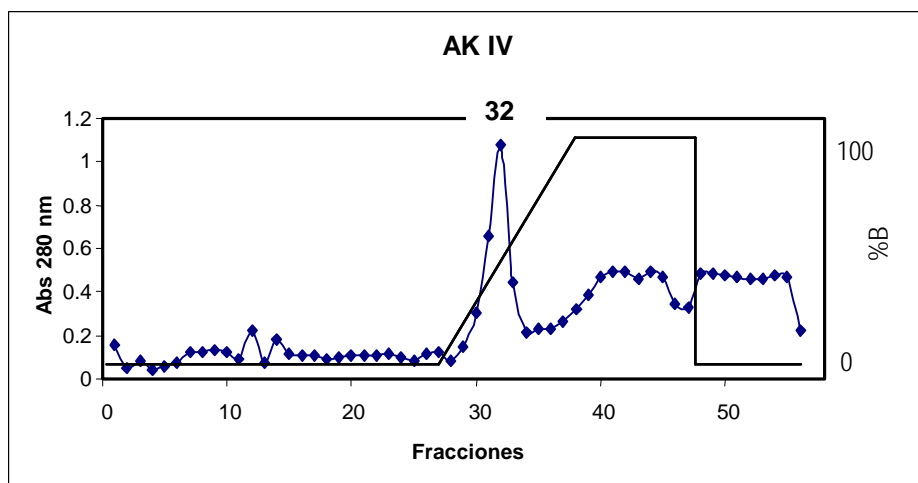


Figura 11. Cromatografía de intercambio iónico. Elución mediante un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1M en el buffer de equilibrio. El contenido de proteína es expresado en Abs 280 nm.

4.2.3.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAA).

Las fracciones 7, 8, 29-34 y 40 fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras, (2-?-mercaptoetanol). El SDS le confiere carga negativa a las proteínas, mientras que el 2-?-mercaptoetanol (2-ME) reduce los enlaces disulfuro (Laemmli, 1970).

En la Figura 12 se observa una proteína de aproximadamente 40 kDa en las fracciones 30 a la 40, conteniendo la fracción 32 la mayor concentración de esta proteína, lo cual concuerda con los resultados de la lectura de Abs. a 280 nm. La concentración de la proteína de las fracciones de lavado (7 y 8) fue muy baja, Además, no se pudo observar ninguna banda de proteína. Por otro lado, en la imagen se observa que las fracciones 31, 32 y 33 contienen, además de la banda de 40 kDa, otras de menor tamaño e intensidad, las cuales pueden ser producto de la degradación de la proteína. Esto posiblemente se debe al tiempo transcurrido a 4°C desde la purificación de la muestra hasta su análisis por electroforesis.

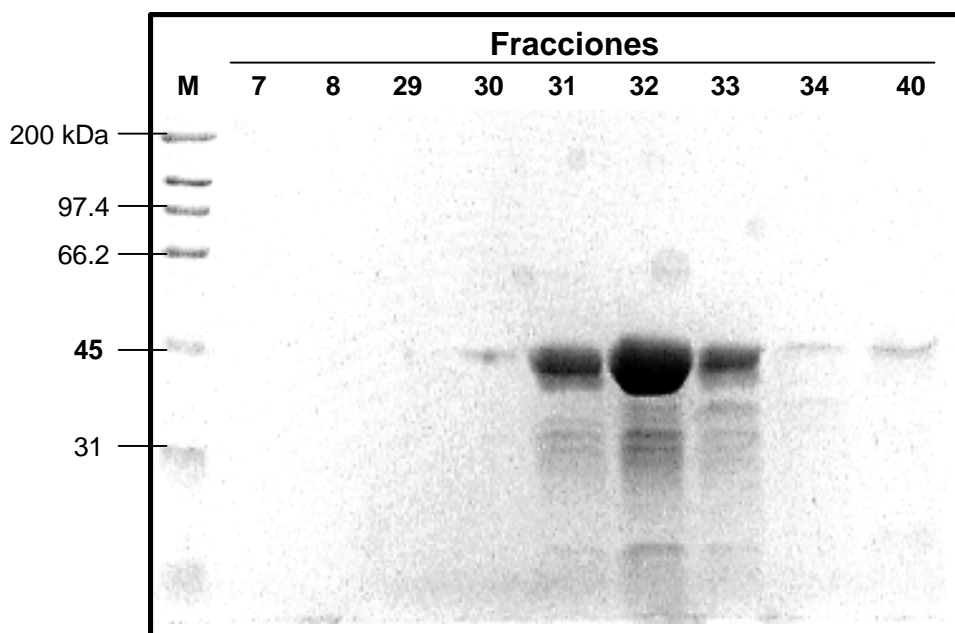


Figura 12. SDS-PAGE con efluentes de la matriz de intercambio iónico. Carril M: Estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad).

La fracción 31 se designó como muestra 1 (**M1**) y las fracciones 32 y 33 se juntaron formando la muestra 2 (**M2**). Ambas muestras se dializaron contra buffer salino (NaCl 0.9%) y posteriormente la muestra 2 se diafiltró con un filtro de 30 kDa con el objetivo de eliminar las bandas de degradación. El método Bradford fue usado para determinar la concentración de proteína en ambas muestras, resultando una concentración de 348 µg/ml para la muestra 1 (fracción 31) y de 1 mg/ml para la muestra 2 (fracciones 32 y 33).

Para determinar que las bandas de menor tamaño mostradas en la Figura 12 eran degradación de la muestra y no bandas contaminantes de otra proteína, se tomó una alícuota de la muestra 2 y se almacenó a 4°C (**M2B**). El resto se almacenó a -20°C (**M2A**). Posteriormente, ambas muestras fueron analizadas en un gel de PAA al 12% cargándose 5, 10 y 20 µg de cada una (M1, M2A y M2B). La electroforesis se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el punto 3.2.4 de este trabajo.

Como resultado de este experimento, en la Figura 13 se observa que las muestras almacenadas a -20°C (M1 y M2A) no contienen fragmentos polipeptídicos menores a 30 kDa.

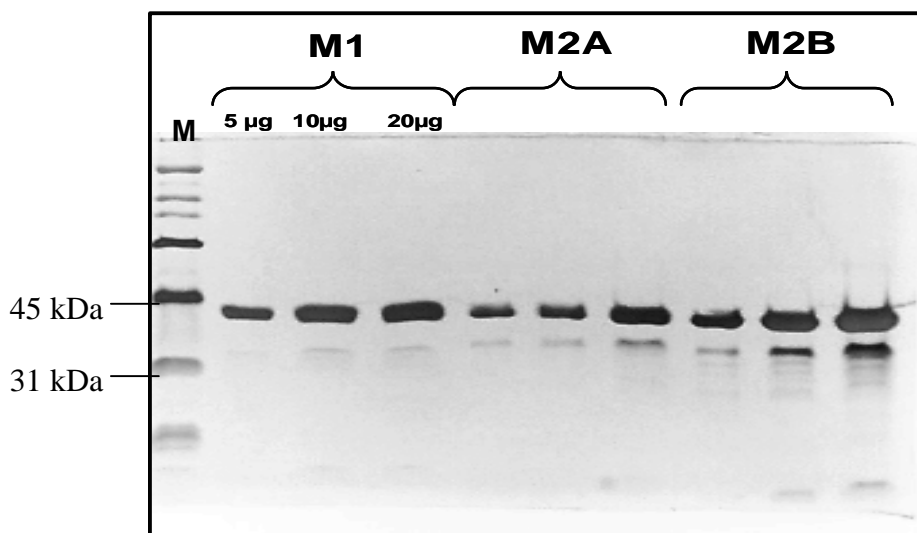


Figura 13. SDS-PAGE, AK pura y dializada contra buffer salino (NaCl 0.9%) en concentraciones alternadas de 5, 10 y 20 µg. Carril M: Estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); carriles M1: muestra almacenada a -20°C; carriles M2A: muestra diafiltrada y almacenada a -20°C; carriles M2B: muestra diafiltrada y almacenada a 4°C.

Lo anterior nos indica que efectivamente la proteína se degrada en condiciones de refrigeración; sin embargo, mediante la diáfiltración pudieron eliminarse las bandas generadas de este fenómeno. Además, se pudo observar que la proteína congelada a -20°C es más estable (M2A). En cambio la M2B almacenada a 4°C , aún cuando fue diafiltrada al mismo tiempo que la M2A, presentó fragmentos menores a 40 kDa, lo que nos indica que la proteína se siguió degradando.

4.3.- Identificación de la Proteína Purificada.

4.3.1.- Actividad Enzimática de la Proteína Purificada.

La proteína purificada presentó actividad específica de arginina cinasa. Para determinar las Unidades de actividad enzimática, los datos de $A_{340\text{nm}}$ se graficaron contra el tiempo (Figura 14), en donde la disminución de la absorbancia representa la oxidación del NADH a NAD^+ . La actividad calculada mediante la ecuación, fue de 8.78 U mg^{-1} . Se llevaron a cabo controles en ausencia de L-arginina y/o ATP, y ninguna actividad fue observada.

Yu *et al.* (2003) reportaron una actividad de 512 U mg^{-1} de proteína para la arginina cinasa de *Penaeus monodon*, mientras que Binder *et al.* (2001), reportaron una actividad de 18.5 U mg^{-1} de la misma proteína en polilla india de la harina (*Plodia interpunctella*). La diferencia en la actividad puede deberse a que en el presente estudio no se llevó a cabo la optimización de la reacción de actividad, ya que sólo se utilizó esta medición como medio de identificación de la proteína.

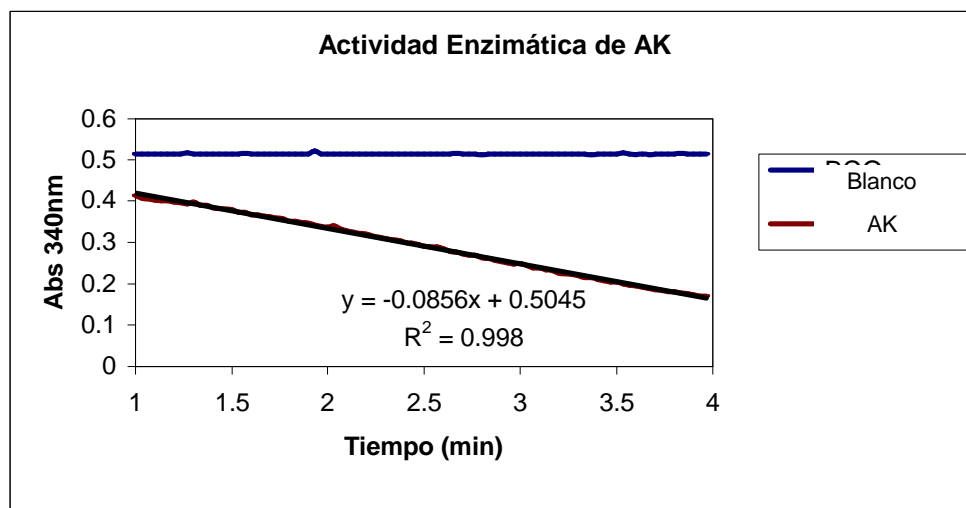


Figura 14. Actividad enzimática de arginina cinasa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

4.4.- Alergenicidad de Arginina Cinasa.

La proteína purificada en el presente estudio, se utilizó en un trabajo de maestría paralelo al presente, en el cual se llevaron a cabo ensayos de alergenidad mediante pruebas de ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas), utilizando sueros de personas alérgicas a camarón, resultando positiva en todos los casos (Montalvo Corral, 2006).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró amplificar la región codificante del gen de arginina cinasa de *L. vannamei* y clonar en un vector de expresión procariote, correspondiendo con la secuencia reportada de otros camarones.

Se purificó a homogeneidad la proteína arginina cinasa mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de Q sepharose.

Se demostró la alergenicidad de la proteína purificada mediante ELISA.

Los resultados de este trabajo pueden dar pie a futuras investigaciones orientadas al diagnóstico de alergias en individuos así como su tratamiento.

El siguiente paso en esta investigación podría ser la transformación del constructo en una cepa de expresión y así poder sobreexpresar y purificar la proteína recombinante. De esta manera, será posible estudiar su estructura física y compararla con la proteína nativa e incluso, en un futuro, podría ser modificada mediante ingeniería genética con el fin de atenuar o bloquear sus propiedades alergénicas.

LITERATURA CITADA

Abbas Abul K., Lichtman Andrew H., Pober Jordan S., 2001. Inmunología celular y molecular. Tercera edición. Mc Graw Hill.. USA. pp 40, 54, 58-63.

Anosike E.O., Moreland B.H., Watts D.C., 1975. Evolutionary variation between a monomer and a dimer arginine kinase. Purification of the enzyme from *Holothuria forskali* and a comparison of some properties with that from *Homarus vulgaris*. Biochem J. 145(3):535–543.

Binder M., Mahler V., Hayek B., Sperr Wolfgang R., Schöller M., Prozell S., Wiedermann G., Valent P., Valenta R. y Duchêne M., 2001; Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. The journal of immunology.

Boyer Rodney F., 1986. Modern experimental Biochemistry. Addison-Wesley Publishing company. pp. 61-63, 80-87, 166, 241y 242.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising principle of protein-dye banding. Anal.Biochem. 72. 248-254

Branden Carl y Tooze John, 1991. Introducción to Protein Structure. Garland Publishing, Inc. New York and London. pp. 3, 4, 21-27.

Cabrera Ricardo, 1997. Microscopio y tiza. Revista EXACTA mente. (Ver <http://www.fcen.uba.ar/publicac/revexact/exacta9/institu1.htm>)

Campbell, N. A., Reece, J. B. and Mitchel, I. G., 1996. Biology. 4th ed. Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.; pp 379-380.

<http://cinvestav.mx/publicaciones/avayper/julsep05/salud.pdf>

<http://www.cideiber.com/infopaises/Mexico/Mexico-04-04.html>

<http://www.cienciaytecnologia.yucatan.gob.mx/noticias/verarticulo.php?IdArticulo=128>

<http://www.comunicacion.amc.edu.mx/noticias/optimizan-investigadores-la-produccion-de-camaron/>

<http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas/perspectivas%20camaron%202003.pdf>

http://www.ine.gob.mx/enautica/download_colmex/cap1-4-3.pdf

http://www.infopesca.org/rep_men_fish/camaron/camaron062005.pdf

<http://www.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=20725>

Knippels L. y Penninks A., 2002. Assessment of protein allergenicity, studies in brown norway rats. Annals of the New York Academy of Sciences 964.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lewin Benjamin, 2001. Genes VII. MARBÁN LIBROS, S.L.España.

Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F., 1982. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Montalvo Corral M., 2006. Proteínas alergénicas de camarón (*Litopenaeus vannamei*): identificación, aislamiento y evaluación de la respuesta humoral y celular de personas alérgicas. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Patrick SC Leung y Ka-Hou Chu., 1998. Molecular and immunological characterization of shellfish allergens. Frontiers in Bioscience 3.

Roitt I. M. y Delves P.J., 2003. Inmunología; fundamentos. Décima edición. Editorial medica panamericana. Argentina. pp 46, 60, 61.

Strong, S. J. y Ellington, W. R., 1995. Isolation and sequence analysis of the gene for arginine kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus polyphemus*: insights into catalytically important residues. Biochim. Biophys. Acta 1246, 197-200.

Stryer Lubert, 1988. Biochemistry 3ra. Ed. USA. W.H. Freeman & company.

Suzuki T., Kawasaki Y., Furukohri T., 1997. Evolution of phosphagen kinase; Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. Biochemistry journal 328, 301-306.

- Taylor Steve L., 2002. Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.
- Teague Walter E., Dobson Geoffrey P. y Dobson Geoffrey P. Jr., 1999. Thermodynamics of the Arginine Kinase Reaction. The journal of biological chemistry.
- Webster David M., 2000. Protein structure prediction; Methods and protocols. Humana Press.
- Yao Cui-Luan, Wu Chang-Gong, Xiang Jian-Hai y Dong Bo, 2005; Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shellfish Immunology 19.
- Yu Chia-Jung, Lin Yu-Fen, Chiang Bor-Luen y Chow Lu-Ping, 2003; Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, pen m 2. The journal of immunology.
- Zhou Genfa, Somasundaram Thayumanasamy, Blanc Eric, Parthasarathy Golapakrishnan, Ellington W. Ross y Chapman Michael S., 1998. Transition State Structure of Arginine Kinase: Implications for Catalysis of Bimolecular Reactions. Biochemistry, USA, Vol. 95, Issue 15, 8449-8454.