

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Interacción de la toxina binaria PirAB de *Vibrio*
parahaemolyticus con proteínas
hepatopancreáticas de camarón blanco
(*Litopenaeus vannamei*)

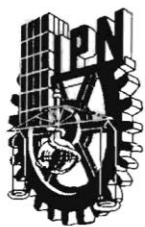
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

NORINELI ALMANZA MARTÍNEZ

LA PAZ, B.C.S., ENERO DE 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 19 del mes de Diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"INTERACCIÓN DE LA TOXINA BINARIA PirAB DE *Vibrio parahaemolyticus*
CON PROTEÍNAS HEPATOPANCREÁTICAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)"

Presentada por el alumno:

ALMANZA

Apellido paterno

MARTÍNEZ

materno

NORINELI

nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	9	2	1
---	---	---	---	---	---	---


Aspirante de:


MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX
Director de Tesis


DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
2º. Director de Tesis


DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVARZ


DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO


DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 10 del mes de Enero del año 2018

El (la) que suscribe QFB. NORINELI ALMANZA MARTÍNEZ Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A160921 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX y DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"INTERACCIÓN DE LA TOXINA BINARIA PirAB DE *Vibrio parahaemolyticus*

CON PROTEÍNAS HEPATOPANCREÁTICAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: nory.martinez.91@gmail.com - ccardona.felix@gmail.com - sergiofranciscomartinez@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

QFB. NORINELI ALMANZA MARTÍNEZ

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) bajo la dirección del Dr. César Salvador Cardona Félix, Catedrático CONACyT comisionado al referido Centro de Investigación y del Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz, Profesor-Investigador del CICIMAR-IPN, con la asesoría de la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, Dr. Ignacio Leyva Valencia y Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, todos Profesores-Investigadores del CICIMAR-IPN, en el período comprendido de febrero de 2016 a enero de 2018.

DEDICATORIA

*A dios por ser el motor de todas las cosas que hago,
a quien ofrezco todo lo que soy
y en lo que me ha convertido.*

*A mis padres, Olga Martínez Flores y José Luis Almanza García,
A mis hermanos, Marco Aurelio Almanza Martínez y
José Luis Almanza Martínez quienes han sido mi
Motor en cada momento de este hermoso viaje
Llamado VIDA. Ustedes son la más
Bella manera en la que la vida
Me dice TE AMO.*

*A mi compañero, mejor amigo y cómplice Juan Carlos Hernández
Padilla, por toda su paciencia, sus consejos, por caminar
Conmigo de la mano en este trayecto y apoyarme en
Todo momento, por compartir conmigo
Esta locura.*

Los amo.

A mis padres

*“El amor es la fuerza que mueve el mundo y ustedes
son el ejemplo perfecto de ello”*

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT por el financiamiento al Proyecto Número 247842 titulado: “*Ensolisinas fágicas recombinante: Nueva estrategia para el control de bacterias patógenas en cultivos de importancia acuícola en México*”, de la convocatoria de proyectos de desarrollo científico para atender problemas nacionales 2014y al Proyecto Número 222100 “Bases para la aplicación de la fagoterapia como alternativa para el control de *Vibrio* en acuicultura” de la convocatoria Ciencia Básica 2012.

Se agradece al CONACyT por la beca de Maestría (596439), la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) por el apoyo económico a través de las becas otorgadas para poder llevar a cabo mis estudios de maestría en esta institucióndurante el período comprendido de febrero de 2016 a enero de 2018.

A mis directores de Tesis el Dr. César Salvador Cardona Félix y Sergio Martínez Díaz por su apoyo, asesoría y dedicación para poder concluir con este proyecto, pero sobre todo por confiar en mí, abrirme las puertas en el laboratorio y darme la oportunidad de trabajar con ustedes y compartir su sabiduría, de corazón, gracias.

A mi comité tutorial Claudia Judith Hernández Guerrero, Ignacio Leyva Valencia y Jesús Iván Murillo Álvarez, por sus comentarios, sugerencias y sobre todo por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Dra. Isabel Gómez Gómez por darme la oportunidad de trabajar en el Departamento de Microbiología Molecular y poder llevar a cabo mi estancia de investigación, por sus aportaciones en este trabajo que lograron que culminara con éxito.

Con mucho cariño a la Dra. María Eugenia Sánchez Sandoval quién me indujo por este camino de locura, la ciencia, pero sobre todo por enseñarme a amar lo que hacemos.

A la Dra. Laura Margarita López Castillo por su amistad, por sus palabras de aliento y su apoyo incondicional en todo momento.

A mi amigo Antonino Flores Pérez gracias por tus sarcasmos en mis momentos de estrés los cuales siempre lograban robarme una sonrisa. Te quiero.

Al Dr. Abel Bello González quién es el culpable de que hayarealizado un posgrado, pero sobre todo le agradezco por velar por mi salud.

A todos los que directa e indirectamente me apoyaron para poder culminar este sueño, gracias por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
GLOSARIO.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Identificación de los receptores de unión de Cry</i>	5
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. HIPÓTESIS	7
5. OBJETIVO	7
5.1 <i>General</i>	7
5.2 <i>Específicos</i>	7
6. METODOLOGÍA	8
6.1 <i>Análisis de secuencias de los genes codificantes de PirA y PirB de diferentes cepas VP_{AHPND} para su inserción en vectores de expresión.</i>	8
6.1.1 <i>Obtención de las cepas</i>	8
6.1.2 <i>Aislamiento de plásmidos</i>	9
6.1.3 <i>Confirmación de la presencia de los genes PirA y PirB</i>	9
6.1.4 <i>Obtención y análisis de secuencias de los genes PirA y PirB</i>	10
6.1.5 <i>Construcción de vectores recombinantes</i>	10
6.1.6 <i>Transformación de células DH5α con los vectores recombinantes</i>	11
6.1.7 <i>PCR de colonia de células DH5α transformadas</i>	12
6.1.8 <i>Doble digestión con enzimas de restricción</i>	12
6.1.9 <i>Transformación de células BL21 con vectores recombinantes de PirA y PirB</i>	12
6.2 <i>Purificación y expresión de las toxinas recombinantes PirA y PirB</i>	13

6.2.1 Pruebas de expresión	13
6.2.2 Purificación en columna de níquel y cuantificación de proteína.....	13
6.3 Ensayos de interacción proteína-proteína con PirAB y proteínas de hepatopáncreas de camarón	14
6.3.1 Preparación y cuantificación de proteínas de hepatopáncreas.....	14
6.3.2 Marcaje de las proteínas PirA y PirB.....	16
6.3.3 Evaluación de la interacción entre PirA y PirB.	16
6.3.4 Evaluación de la interacción de las proteínas recombinantes PirA y PirB con proteínas hepatopancreáticas	17
6.3.5 Evaluación de la especificidad de la interacción proteína-proteína	17
7. RESULTADOS.....	17
7.1 Análisis de secuencias de los genes codificantes de PirA y PirB de diferentes cepas VP _{AHPND}	17
7.1.1 Plásmidos aislados	17
7.1.2 Evaluación de la presencia de los genes PirA y PirB	19
7.1.3 Análisis de las secuencias de los genes PirA y PirB	19
7.1.4 Células DH5 α transformadas con los vectores recombinantes	20
7.1.5 Comprobación de clonas positivas de PirA: mediante PCR de colonia	20
7.1.6 Comprobación de clonas positivas de PirA: mediante doble digestión con enzimas de restricción	21
7.1.7 Transformación de células BL21 con los vectores recombinantes de PirA y PirB.....	23
7.2 Purificación y expresión de las toxinas recombinantes PirA y PirB	24
7.2.1 Expresión de las toxinas	24
7.2.2 Purificación de la toxina PirA.....	25
7.2.3 Purificación de la toxina PirB.....	26
7.3 Ensayos de interacción proteína-proteína con PirAB y proteínas de camarón.....	27
7.3.1 Proteínas PirA y PirB marcadas con biotina	27
7.3.2 Interacción entre PirA y PirB	27
7.3.3 Interacciones proteína-proteína	28
7.3.4 Especificidad de la interacción proteína-proteína.....	29

8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES.....	38
PERSPECTIVAS	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de electroforesis del aislamiento de plásmidos. A) Plásmidos de cepas aisladas en Sinaloa (M) y Baja California Sur (G); B) Plásmidos de cepas aisladas en Baja California Sur (V). Cepa control *V. parahaemolyticus* (17802)... 18

Figura 2. Productos de PCR de las colonias con el vector recombinante de PirA y pGEM. Los números en color rojo indican las colonias seleccionadas para la digestión con enzimas de restricción. La flecha roja indica la banda del gen de PirA..... 21

Figura 3. Doble digestión con enzimas de restricción del vector de las colonias positivas a la PCR de colonia. Los números en rojo indican el número de colonia cuyo vector liberó el gen de PirA, en negro el número de colonia cuyo vector no liberó el gen de PirA, la flecha en rojo a las 336 pb corresponde al gen de PirA liberado del vector, la flecha roja a la altura de 3,000 pb corresponde al vector pGEM linearizado. 22

Figura 4. Vectores de expresión recombinante: A) Vector recombinante con el gen que codifica para la toxina PirA, la flecha azul indica el gen de PirA; B) Vector recombinante con el gen que codifica para la toxina PirB la flecha roja indica el gen de PirB. 23

Figura 5.A) Expresión de la toxina PirA; B) Expresión de la toxina PirB. La flecha indica la banda de expresión de ambas proteínas. 24

Figura 6. A) Purificación de la toxina recombinante PirA; B: botón, FS: fracción soluble, FT: fracción soluble filtrada, E: elusión. La flecha indica la banda de la proteína PirA purificada; B) Membrana de PDVF con las eluciones 2 y 3 en la prueba de Western Blot con anticuerpos anti-Histidinas. La flecha indica la banda de la proteína PirA detectada mediante anticuerpos anti-Histidinas. 25

Figura 7. A) Purificación de la toxina recombinante PirB; MP: marcador de peso molecular, L1: lavado 1, E: elusión. La flecha indica la banda de la proteína PirB purificada; B) Membrana de PDVF con la fracción soluble (FS) y la proteína purificada (PU) en la prueba de Western Blot con anticuerpos anti-Histidinas. La

flecha indica la banda de la proteína PirB detectada mediante anticuerpos anti-Histidinas. 26

Figura 8. Representación de las proteínas biotilinizadas: la banda de 14 kDa y 50 kDa corresponden a PirA y PirB respectivamente, marcadas con biotina. 27

Figura 9. Representación de la interacción entre PirA y PirB. Las dos primeras bandas en aproximadamente 14kDa corresponden a PirA en concentraciones de 0.5 y 2.0 µg interaccionando con PirB, las bandas en 50kDa corresponden a PirB en concentraciones de 0.5 y 2.0 µg interaccionando con PirA. 28

Figura 10. Interacciones de PirA y PirB con las proteínas de hepatopáncreas de camarón; MP: marcador de peso molecular, el número en cada carril indica el hepatopáncreas (1-4) del camarón con el que se realizó la prueba. En la prueba con PirB la banda de 50kDa aproximadamente en los carriles 1-4, indica la interacción entre la(s) proteína(s) del hepatopáncreas con la toxina PirB. 29

Figura 11. Unión específica de PirB con las proteínas de hepatopáncreas; MP: marcador de peso molecular, la banda de 50 kDa aproximadamente, indica la interacción entre la(s) proteína(s) del hepatopáncreas con la toxina PirB marcada con biotina, cuya concentración inicial es de 25 µg en las tres muestras (hepatopáncreas). 30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Nombre y lugar de origen las cepas.	8
Tabla 2.Oligonucleótidos empleados para confirmación de la presencia de genes PirA y PirB en cepas de <i>V. parahaemolyticus</i>	10
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para construcción de vectores recombinantes.	11
Tabla 4.Condiciones de expresión para PirA y PirB.	13
Tabla 5. Condiciones de prueba para la purificación de PirA y PirB.	15
Tabla 6. Identificación de cepas Vp _{AHPND}	19
Tabla 7. Identidad de la secuencia de los genes de PirA y PirB de cepas VP _{AHPND} aisladas en México con los genes reportados en la base de GenBank.	20

ABREVIATURAS

ADN.- Ácido Desoxirribonucleico

AHPND.- Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (del inglés Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease)

ALP.- Fosfatasa alcalina (del inglés Alkaline Phosphatase)

APN.- Aminopeptidasa N

CTAB.- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

dNTP.- Desoxinucleótidos Trifosfato

EMS.- Síndrome de Mortalidad Temprana (del inglés Early Mortality Syndrome)

FAO.- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés Food and Agriculture Organization)

HP.- Hepatopáncreas

HRP.- Peroxidasa de rábano picante (del inglés Horseradish Peroxidase)

IPN.- Instituto Politécnico Nacional

Kpb.- Kilopares de bases (1,000 pares de bases)

LB.- Medio Luria Bertani (del inglés Luria Broth)

OD.- Densidad Óptica (del inglés Optical Density)

pb.- Pares de Base

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

pH.- Potencial de hidrógeno

PVDF.- Polifluoruro de Vinilideno

µg.- microgramo (1×10^{-6} g)

V.p.- *Vibrio parahaemolyticus*

VP_{AHPND}- *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND

STET.- Regulador de lisis para en la purificación de ADN

GLOSARIO

Aminopeptidasa N: Enzima que se encarga de cortar los aminoácidos de los polipéptidos en su extremo N-terminal.

Bacillus thuringiensis: Es una bacteria Gram-positiva que habita en el suelo, la cual ha sido ampliamente estudiada por ser una alternativa biológica a los plaguicidas debido a su capacidad para producir la toxina Cry causante directa de la muerte en insectos.

Caderina: Es una proteína transmembranal que participa entre otras cosas, en la estabilidad del citoesqueleto de la célula.

Enfermedad de necrosis hepatopáncreática aguda (AHPND): Es una enfermedad emergente severa que se caracteriza por producir daño en el hepatopáncreas de camarones peneidos produciendo desprendimiento celular en dicho órgano, es producida por *Vibrio parahaemolyticus*.

Fosfatasa alcalina: La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de grupos fosfato de varios tipos de moléculas como nucleótidos y proteínas.

Hepatopáncreas: Es el órgano más importante del sistema digestivo de los camarones, interviene en muchas funciones metabólicas como síntesis, absorción, secreción y metabolismos de lípidos e hidratos de carbono.

Interacciones proteína-proteína: Son los contactos físicos que se dan entre las proteínas en determinadas regiones moleculares.

Plásmido pVA1: Es un ADN extracromosomal que se encuentra en *Vibrio parahaemolyticus*, dónde se lleva a cabo la síntesis de la toxina binaria PirAB.

Purificación de proteínas: Serie de procesos cuyo objetivo es concentrar de manera diferencial a la proteína blanco.

Receptores anclados a glicosilfosfatidil-inositol (GPI): Proteínas ancladas a la membrana mediante un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI).

Receptor de membrana: Son proteínas ancladas en la superficie de la membrana celular con capacidad de interactuar con proteínas del exterior de la célula.

Toxina Cry: Proteína en forma de cristal producida por *Bacillus thuringiensis* con capacidad insecticida.

Toxina PirAB: Es un complejo proteico formado por la toxina PirA y la toxina PirB, dichas toxinas son secretadas por *Vibrio parahaemolyticus* y son las causantes del desprendimiento celular en el hepatopáncreas del camarón.

Vibrio parahaemolyticus: Es una bacteria Gram-negativa que habita en ambientes marinos y es la causante de la enfermedad de necrosis hepatopáncreática aguda.

RESUMEN

La Enfermedad de Necrosis Hepatopáncreática Aguda (AHPND) provoca pérdidas económicas en la industria camaronícola a nivel global. Esta enfermedad se produce por acción de la toxina binaria PirAB de *Vibrio parahaemolyticus* (VP). Hasta al momento se han propuesto una serie de estrategias basadas en mejoras en el manejo del cultivo para reducir el efecto del AHPND; sin embargo, no son del todo efectivas, particularmente porque no es una infección típica, sino que depende de la acción de la toxina de VP, la que provoca daños severos en hepatopáncreas. Considerando que PirAB es estructuralmente homóloga con la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*, y que en ese caso su acción inicia con la unión de Cry en células del intestino medio de insectos, el objetivo de este trabajo fue demostrar que existe una interacción de PirAB de *V. parahaemolyticus* con proteínas de hepatopáncreas de camarón. Para ello, en el presente trabajo los genes que codifican a PirAB fueron sintetizados y clonados. Estos genes se insertaron en vectores de expresión (pColdI y pET28a) y su versión recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel. Se realizaron pruebas de interacción proteína-proteína en membrana de PVDF con lo cual se logró determinar la interacción de PirB con alguna(s) de las proteínas del hepatopáncreas del camarón las cuales aparentemente actúan como los receptores de unión de dicha toxina. Estas proteínas pudieran funcionar como receptores de unión, y como en el caso de Cry, la toxina PirAB pudiera inducir la formación de poros en la membrana celular, lo cual produce la lisis celular de la célula blanco. Por lo que, una vez determinada la técnica de interacción se podría realizar la identificación de los receptores de unión de dicha toxina lo cual puede ser la base para el desarrollo de nuevas estrategias de control.

Palabras clave: AHPND, PirAB, *V. parahaemolyticus*, receptor, hepatopáncreas.

ABSTRACT

The Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) has generated great economic losses in the shrimp industry globally. This disease is produced by the binary PirAB toxin from *Vibrio parahaemolyticus*. To date, a series of strategies to reduce the effect of AHPND; however, they are not entirely effective, particularly because it is not a typical infection, but depends on the action of the VP toxin, which causes severe damage to hepatopancreas. Considering that PirAB is structurally homologous with the Cry toxin of *Bacillus thuringiensis*, and that in this case its action begins with the binding of Cry in cells of the midgut of insects, the objective of this work was to demonstrate that there is an interaction of PirAB of *V. parahaemolyticus* with shrimp hepatopancreas proteins. For this, in the present work the genes that encode PirAB were cloned and synthesized. These genes were inserted into expression vectors (pColdI and pET28a) and their recombinant version was purified by nickel affinity chromatography. Protein-protein interaction tests were carried out on PVDF membrane, which allowed us to determine the interaction of PirB with some of the proteins of the shrimp hepatopancreas which apparently act as the binding receptors of said toxin. These proteins could function as binding receptors, and as in the case of Cry, the PirAB toxin could induce the formation of pores in the cell membrane, which produces the cell lysis of the target cell. Therefore, once the interaction technique was determined, the identification of the binding receptors of said toxin could be made, which can be the basis for the development of new control strategies.

Key words: AHPND, PirAB, *V. parahaemolyticus*, receptor, hepatopancreas.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del camarón constituye una importante fuente de ingresos y empleo en muchos países en desarrollo. Sin embargo, las enfermedades infecciosas afectan seriamente la rentabilidad de la industria camaronera. Entre las bacterias patógenas destaca *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria Gram-negativa que habita en ambientes marinos. Particularmente, esta bacteria ha sido relacionada con la enfermedad de Necrosis Hepatopáncreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés; Tran *et al.*, 2013), la cual inicialmente fue descrita como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS, por sus siglas en inglés). Esta enfermedad ha sido diagnosticada en camarones peneidos (particularmente *Penaeus monodon*, Fabricius, 1798 y *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) y ha sido reportada en países del Pacífico Asiático incluyendo China (2009), Vietnam (2010), Malasia (2011), Tailandia (2012); propagándose más recientemente en el Pacífico Mexicano (2013) y el resto de América (Chamberlain, 2013).

La AHPND ha provocado problemas graves a nivel mundial por la reducción de los volúmenes de producción y el cierre de empresas. Lo anterior debido a que esta enfermedad puede causar una tasa de mortalidad de hasta un 100% en tan sólo 30 días de infección (Han *et al.*, 2015). Desde el año 2006 hasta el año 2011, fueron reportadas tasas de crecimiento anual en la producción camaronera de 4.8%; sin embargo, para el año 2013, se reportaron pérdidas de hasta un 23%, en las expectativas de la producción de camarón (Chamberlain, 2013). En México, los sistemas acuícolas con mayor producción se encuentran en Sonora, Sinaloa y Nayarit y éstos no han estado exentos de esta enfermedad. El primer caso de AHPND reportado en México se presentó en marzo del 2013 en el estado de Nayarit, posteriormente se reportó en Sinaloa y Sonora (Trujillo-García, 2016). En estos estados, se han reportado pérdidas de hasta un 3.5% en la producción anual de camarón. Debido a lo anterior, se han realizado algunos estudios fisiológicos para identificar el daño que esta enfermedad causa en los camarones (Tran *et al.*, 2013; Sirikharin *et al.*, 2015).

A partir de estudios histológicos se ha determinado que la enfermedad afecta el tejido de hepatopáncreas de los camarones afectados, en el que las células epiteliales del túbulo se degeneran, se agregan, y se desprenden de la membrana basal y posteriormente llegan a la luz del túbulo. La AHPND tiene dos etapas, la etapa temprana y la etapa aguda. En la etapa temprana el hepatopáncreas tiene una coloración blanquecina, esto debido a la pérdida de la pigmentación de las células R (las cuales sintetizan glucógeno y lípidos). En la etapa aguda las células presentan una cariomegalia prominente (agrandamiento del núcleo celular), estas células se desprenden y llegan a ser necróticas en los túbulos del hepatopáncreas o del lumen en el intestino, esto es lo que le da la coloración necrótica. En esta etapa también se observa agregación hemocítica, y finalmente el camarón afectado muere por disfunción del hepatopáncreas. La respuesta inflamatoria que está usualmente suscitada por un patógeno no es evidente en la etapa temprana, esto sugiere fuertemente una etiología por toxinas (Han *et al.*, 2015). Lightner *et al.* (2015) describieron el agente causal como una cepa virulenta de *V. parahaemolyticus* (denominada VP_{AHPND}) que coloniza el estómago del camarón, produce una potente toxina y causa daño agudo al hepatopáncreas. Las cepas VP_{AHPND} poseen un plásmido de 70 Kpb (denominado pVA1) el cual, contiene un “Sistema de Muerte Postsegregacional” (PSK, por sus siglas en inglés). Dicho sistema se ha descrito en otros microorganismos y se sabe que expresa toxinas las cuales, en algunos casos, controlan la proliferación de otras bacterias (Gerdes *et al.*, 1986). Lo anterior hace suponer que los factores de virulencia; incluyendo los genes que codifican a las toxinas PirA y PirB, pueden ser transferidos no sólo entre cepas de *V. parahaemolyticus*, sino también a diferentes especies bacterianas. En este sentido, recientemente en Vietnam se identificó una cepa de *Vibrio harveyi* que aparentemente es capaz de provocar AHPND (Rosenberry, 1996).

PirAB es sintetizada en forma de dos subunidades, denominadas PirA (14.0 kDa) y PirB (50.0 kDa) (Lee *et al.*, 2015). Por lo que PirAB es una toxina binaria y es codificada por el plásmido PVA1, los genes de PirA y PirB son homólogos de las toxinas producidas por la bacteria *Photobacterium luminescens*, las cuales se

producen en simbiosis con Nematodos entomopatógenos (relacionadas a insectos, PIR, por sus siglas en inglés) y tienen propiedades insecticidas.

Se han realizado algunos estudios desde un enfoque molecular para tratar de inhibir la AHPND, sin embargo, no han sido del todo exitosos, probablemente en parte debido a la falta de conocimiento del mecanismo de acción de la toxina incluyendo los receptores a los cuales se une en el tejido que daña, así como el proceso que genera en el interior de las células. Por ello, en este estudio el objetivo general se vincula a demostrar que existe una interacción específica de PirAB de *V. parahaemolyticus* con proteínas de hepatopáncreas de camarón; las cuales pudieran funcionar como posibles receptores de unión. Lo anterior nos permitiría generar una idea más clara sobre el mecanismo de acción de la toxina y así poder diseñar estrategias orientadas a bloquear la acción de la toxina.

2. ANTECEDENTES

El cultivo de camarones una actividad económica muy importante en países de Asia y América. China posee el primer lugar de producción a nivel mundial (SOFIA, 2016) y en México, los estados del Noroeste (Sonora, Sinaloa y Nayarit) son los principales productores, con una producción en la que el camarón es el principal producto por volumen y valor de la producción (DOF, 2012). Sin embargo, la industria camaronícola siempre se ha visto afectada por enfermedades infecciosas emergentes de origen bacteriano y viral que ponen en peligro su producción (Lightner *et al.*, 1983; Kroll *et al.*, 1991; Mohny *et al.*, 1994; Flegel, 1997; Hasson *et al.*, 1999).

La AHPND fue reportada en Asia por primera en 2009 y actualmente causa pérdidas anuales de miles de millones de dólares a nivel mundial (FAO, 2016). No existe una cura específica para la AHPND pero se sugiere extremar las condiciones de manejo como única medida para reducir sus efectos. Existen diversas propuestas para proteger a los camarones del efecto de la toxina PirAB, incluyendo vacunas de células atenuadas con formalina y el uso de

inmunoglobulina Y de yema de huevo, ambas son inmunoestimuladores y confieren protección parcial contra la AHPND (Hirono *et al.*, 2016). Se sabe que la toxina PirA por sí sola no produce la AHPND, sino que solo actúa como complemento de PirB para producir lesiones (Lee *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015); de manera interesante se han propuesto que PirA puede servir como un inmunoestimulador para proteger parcialmente a los camarones expuestos a cepas VP_{AHPND} (Campa-Córdova *et al.*, 2017).

Otras estrategias evaluadas incluyen la neutralización de la actividad de las toxinas PirA y PirB con anticuerpos desplegados en fagos, sin embargo, no se obtuvieron mejoras significativas a las 48 horas de infección (Trujillo-García, 2016). También se ha determinado que el pH actúa como un detonador ambiental clave en la mortalidad del camarón durante eventos de AHPND. En un pH con un valor de alrededor de 7 la enfermedad tiene una regresión gradual, mientras que en un pH entre 8.5 y 8.8, la enfermedad se manifiesta repetidamente. Con un control de pH se logró disminuir en un 20% la mortalidad de camarones (Akazawa *et al.*, 2013). Actualmente existe una patente (Calibrin-Z WO2015017336A1) para el control de la AHPND a base de arcilla la cual adsorbe parcialmente a la toxina PirAB con lo cual teóricamente se disminuye los efectos de la enfermedad.

El mecanismo de acción de la toxina binaria PirAB de *Vibrio parahaemolyticus* ha sido poco estudiado, y tampoco es claro el mecanismo de acción de su homóloga PirAB de *P. luminescens* (Rodou *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha observado una elevada homología entre la estructura cristalográfica de PirA (código PDB 3X0T) y PirB (código PDB 3X0U) de VP_{AHPND} con la toxina Cry de *B. thuringensis*; la cual posee actividad formadora de poros en células epiteliales de insectos. Al alinearlas, se observa que PirA puede emular el dominio III de Cry (con homología estructural de 80%) el cual participa en el reconocimiento del receptor. Mientras que PirB puede emular los dominios I y II, en donde el dominio II se une al receptor, mientras que el dominio I es el que forma el poro que se inserta en la membrana de la célula blanco. En este alineamiento también se obtienen homología estructural de hasta un 75% (Lee

et al., 2015). En estudios recientes se ha observado que el dominio N-terminal de PirB lo constituye un conjunto de α -hélices cuya conformación es consistente con proteínas formadoras de poro, mientras que el dominio C-terminal de PirB contiene un plegamiento del tipo inmunoglobulina que está involucrado en el reconocimiento del receptor. En el caso de PirA, esta posee un plegamiento similar al dominio III de Cry el cual es capaz de unirse al azúcar N-acetilgalactosamina de la APN (Lin *et al.*, 2017). Con base en estos resultados se sabe que la toxina PirAB puede inducir la muerte celular mediante las secuencias de procesos que han sido identificados en el mecanismo de acción de Cry. Funcionalmente la toxina Cry induce la muerte celular a través de una serie de procesos que incluyen unión a receptor, oligomerización y formación de poros (Gómez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2015; Zuñiga-Navarrete *et al.*, 2015).

El dominio I de Cry es reconocido como el dominio formador de poros el cual está constituido por 7 α -hélices (1 α -7 α), que rodean a la hélice α 5 la cual es altamente hidrofóbica (Lin *et al.*, 2014). El dominio II es un prisma de láminas β con regiones expuestas, las cuales están involucradas en el reconocimiento de proteínas en las membranas celulares. El dominio III está compuesto por dos láminas β antiparalelas las cuales están involucradas en el reconocimiento del receptor de aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP).

2.1 Identificación de los receptores de unión de Cry

Se conoce que un paso crucial en el mecanismo de acción de la toxina Cry es la unión al receptor. De aquí la importancia del estudio de técnicas que permitan llevar a cabo su identificación, ya que éstos son factores clave en la especificidad que tiene la toxina. En este contexto, Zhou *et al.*, (2016) mediante un método improvisado de interacciones proteína-proteína en agarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr), identificaron a las proteínas de membrana a las cuales se une Cry1Ac en *Helicoverpa armigera*, un gusano que afecta a una amplia gama de plantas cultivables. Dentro de éstos, se encontró el receptor

transmembranal de caderina y los receptores acoplados a membrana por medio de un grupo GPI como la APN y la ALP. Así mismo, Onofre *et al.*, (2017) identificaron los receptores de unión de la toxina Cry2Ab en *Manduca sexta*, mediante la incubación de las proteínas del tejido blanco con la toxina Cry2Ab biotinilizada. Con esto, lograron evidenciar que la aminopeptidasa N-2 es el receptor principal. Dichos trabajos han permitido conocer acerca del mecanismo de acción de estas toxinas en el tejido blanco, al dilucidar sus receptores de unión en la membrana celular.

Con la finalidad de encontrar estrategias más efectivas en el control de la AHPND y debido a que hasta el momento no se han estudiado experimentalmente los procesos del mecanismo de acción de PirAB, el presente estudio se enfoca en la extrapolación de técnicas utilizadas en Cry, para poder determinar la interacción de la proteína PirAB de *V. parahaemolyticus* con proteínas de hepatopáncreas de camarón blanco lo cual pudiera permitir la identificación de los receptores de unión de PirAB, ya que a partir de éstos sería posible demostrar experimentalmente la unión de dicha toxina a su receptor, paso crucial en su mecanismo de acción.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la AHPND es causada por *Vibrio* y que los factores de virulencia se encuentran en regiones móviles de ADN, es altamente probable la transferencia de estos factores entre las bacterias. Por tal motivo, es difícil erradicar esta enfermedad de los entornos de producción acuícolas. Por lo tanto, esto hace que su control requiera un enfoque diferente a las estrategias utilizadas tradicionalmente contra otras enfermedades en camarón; incluyendo las de origen viral. Hasta el momento no existen alternativas exitosas para controlar la AHPND. Esto tiene relación con la poca información existente sobre el mecanismo de acción de la toxina PirAB. En los trabajos anteriormente citados, se observó que algunas familias de camarones presentan resistencia a dicha toxina (Hirono *et al.*, 2016), lo anterior posiblemente debido a algún tipo de mutación en las proteínas receptoras de las toxinas, de tal forma que el camarón adquiere cierta protección.

Por esta razón es importante conocer cómo se comporta la toxina en el tejido blanco, así como determinar las técnicas que permitan identificar cuáles son los receptores a los cuales se une. Ambos componentes son una parte fundamental para el esclarecimiento de su mecanismo de acción, a partir de lo cual los trabajos de investigación sobre la inhibición de PirAB pueden ser enfocados. Por lo tanto, si se conoce que la toxina PirAB posee una alta homología estructural con la toxina Cry, se espera que al extrapolar las técnicas de interacción utilizadas en Cry se pueda demostrar la interacción entre la toxina PirAB y con las proteínas del hepatopáncreas de camarón.

4. HIPÓTESIS

Dada la similitud estructural entre la toxina binaria PirAB de *Vibrio parahaemolyticus* y la toxina Cry de *Bacillus thuringensis*, es posible demostrar la interacción de PirAB con proteínas del hepatopáncreas de camarón mediante el uso de técnicas similares utilizadas en Cry.

5. OBJETIVO

5.1 General

Demostrar la interacción de la toxina binaria PirAB de *V. parahaemolyticus* con proteínas de hepatopáncreas de camarón.

5.2 Específicos

1. Analizar las secuencias de los genes codificantes de PirA y PirB de diferentes cepas VP_{AHPND} para su inserción en vectores de expresión.
2. Estandarizar condiciones de inducción y purificación para las toxinas recombinantes PirA y PirB de *V. parahaemolyticus*.

3. Efectuar ensayos de interacción proteína-proteína con las toxinas recombinantes PirAB y proteínas del hepatopáncreas de camarón.

6. METODOLOGÍA

6.1 Análisis de secuencias de los genes codificantes de PirA y PirB de diferentes cepas VP_{AHPND} para su inserción en vectores de expresión.

6.1.1 Obtención de las cepas

Para el presente estudio se usaron diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas durante brotes de AHPND en granjas de camarón de Sinaloa y Baja California Sur (**Tabla 1**). Por otro lado, se usó la cepa *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 como control negativo.

Tabla 1. Nombre y lugar de origen las cepas.

No.	Cepa	Lugar de origen	No.	Cepa	Lugar de origen
1	17802	Control (-)	16	G10	Baja California Sur
2	M8	Sinaloa	17	G11	Baja California Sur
3	M9	Sinaloa	18	V2	Baja California Sur
4	M22	Sinaloa	19	V4	Baja California Sur
5	M30	Sinaloa	20	V5	Baja California Sur
6	M37	Sinaloa	21	V6	Baja California Sur
7	G1a	Baja California Sur	22	V7	Baja California Sur
8	G1b	Baja California Sur	23	V8	Baja California Sur
9	G2	Baja California Sur	24	V9	Baja California Sur
10	G3	Baja California Sur	25	V10	Baja California Sur
11	G4	Baja California Sur	26	V11	Baja California Sur
12	G6	Baja California Sur	27	V14	Baja California Sur
13	G7	Baja California Sur	28	V15	Baja California Sur
14	G8	Baja California Sur	29	V16	Baja California Sur
15	G9	Baja California Sur	30	V18	Baja California Sur

6.1.2 Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron extraídos usando una solución STET (8% sacarosa, 0.1% Tritón X-100, 50 mM EDTA y 50 mM de Tris-HCl pH 8.0). Para esto, un cultivo de aproximadamente 12 horas de incubación a 30°C y 150 rpm fue centrifugado a 14,000 x g por 2 minutos. El sobrenadante fue eliminado mientras que el paquete celular se resuspendió en 500 µl de solución STET seguido por la adición de 5 µl de lisozima (100 mg/ml). Se incubó por 5 minutos a 37°C y posteriormente a 95°C por 1 minuto. La mezcla fue centrifugada a 13,000 x g por 15 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se mezcló con 5 µl de RNasa (10 mg/ml) y 20 µl de CTAB (Bromuro hexadeciltrimetilamonio) al 5%. La mezcla se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 13,000 x g por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 300 µl de NaCl 1.2 M. Se eliminó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 750 µl de etanol absoluto. Se centrifugó por 20 min a 13,000 x g, se decantó y el precipitado fue lavado con 500 µl de etanol al 70%. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a 13,000 x g. El ADN se dejó secar a 37°C durante toda la noche. Una vez seco el ADN se resuspendió en agua destilada. La integridad del ADN fue evaluada en un gel de agarosa al 1% y con un nano-espectrofotómetro ND-100 (NanoDrop®, Delaware, EE.UU.), estableciendo una relación de absorbancia a una longitud de 260 y 280 nm entre un rango de 1.8-2.0. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.1.3 Confirmación de la presencia de los genes PirA y PirB

Los genes que codifican para PirA y PirB fueron amplificados por PCR punto final, usando los oligonucleótidos de la **Tabla 2**. El ADN de cada una de las cepas a identificar se usó a una concentración de 100 ng/µl y 10 pg/µl de oligonucleótidos. Las condiciones de amplificación fueron: para PirA (AP3), desnaturalización a 94°C por 5 minutos con 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 40

segundos, extensión final 72°C por 5 minutos; mientras que para PirB, desnaturalización a 94°C por 5 minutos con 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 45 segundos, extensión a 68°C por 79 segundos, extensión final a 68°C por 5 minutos (Lee *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2014).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para confirmación de la presencia de genes PirA y PirB en cepas de *V. parahaemolyticus*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
AP3-F	ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAAC
AP3-R	TTAGTGGTAATAGATTGTACAG
PirB-F	ATGACTAACGAATACGTTGTAAC
PirB-R	CTACTTTTCTGTACCAAATTCAT

6.1.4 Obtención y análisis de secuencias de los genes PirA y PirB

Los amplicones de cada una de las cepas fueron enviados a secuenciar a la empresa MacroGen (MacroGen, Inc., Seoul) para confirmar que se trata del gen de interés. Con las secuencias se realizó un alineamiento utilizando el programa Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y se comparó con secuencias de referencia de PirA y PirB de las cepas aisladas en China y depositadas en el GenBank (Gene Name: PirB 20494510 y PirA 20494509).

6.1.5 Construcción de vectores recombinantes

Los genes codificantes de las toxinas PirA y PirB fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos PirA-F-NdeI/PirA-R-BamHI y PirB-F-NheI/PirB-R-BamHI (**Tabla 3**), respectivamente. El programa de amplificación para PirA-F-NdeI/PirA-R-BamHI fue: desnaturalización a 98°C por 30 segundos con 34 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, alineamiento a 62.6°C por 30

segundos, extensión a 72°C por 20 segundos, extensión final a 72°C por 5 minutos; mientras que para PirB-F-NheI/PirB-R-BamHI, desnaturalización a 98°C por 30 segundos con 34 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, alineamiento a 67.5°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 20 segundos, extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron confirmados por secuenciación como se describió previamente. De manera individual, dichos productos fueron clonados en el vector pGEM. Las construcciones resultantes fueron transformadas en cepas de clonación DH5α de *Escherichia coli* mediante choque térmico (Sambrook & Russell, 2001).

6.1.6 Transformación de células DH5α con los vectores recombinantes

La transformación de células se hizo con choque térmico siguiendo el protocolo de Sambrook y Russell (2001) donde se agregaron 5 µl del vector recombinante (20 ng/µl), se incubó por 15 minutos en hielo, transcurrido el período de incubación, se les dio un choque térmico a las células, a 42°C por 45 segundos e inmediatamente se colocaron en un baño de hielo donde se dejaron por 15 minutos. Las células se sembraron en cajas Petri con medio Luria-Bertani (LB) + ampicilina a una concentración final de 200 µg/ml. Las cajas se incubaron a 37°C por 16 horas (Sambrook y Russell 2001). A las colonias que crecieron en el medio se les realizaron 3 pruebas de confirmación: PCR de colonia, doble digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para construcción de vectores recombinantes.

Nombre	Secuencia (5'-3')
PirA-F-NdeI	ggtcggaattcCATATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC
PirA-R-BamHI	ggttggGGATCCTTAGTGGTAATAGATTGTACAG
PirB-F-NheI	ctaGCTAGCATGACTAACGAATACGTTGTAAC
PirB-R-BamHI	ggttggGGATCCCTACTTTTCTGTACCAAATTCAT

6.1.7 PCR de colonia de células DH5 α transformadas

La transformación se confirmó con una PCR de colonia con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 minutos con 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 40 segundos, extensión final a 72°C por 5 minutos. Con los oligonucleótidos sentido y anti-sentido de AP3 a una concentración de 10 pg/ μ l.

6.1.8 Doble digestión con enzimas de restricción

Se eligieron 4 colonias positivas confirmadas por PCR, se les realizó una extracción de plásmido y se sometieron a digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Las colonias donde se observa la liberación del fragmento se enviaron a secuenciar a MacroGen.

6.1.9 Transformación de células BL21 con vectores recombinantes de PirA y PirB

La transformación de células se hizo con choque térmico siguiendo el protocolo de Sambrook y Russell (2001). Se tomó 1 μ l de los vectores recombinantes (PirA 100 ng/ μ l, PirB 80 ng/ μ l) y se agregaron a 50 μ l de células competentes BL21. Las células transformadas con pCold-PirA se sembraron en agar LB suplementado con una concentración final de 200 μ g/ml de ampicilina. Para las células con pET28a-PirB se agregaron 25 μ l de kanamicina a una concentración de 50 μ g/ml. Las placas se incubaron por un período de 16 horas a 37°C.

6.2 Purificación y expresión de las toxinas recombinantes PirA y PirB

6.2.1 Pruebas de expresión

La expresión se realizó por adición de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a un cultivo celular de medio LB + ampicilina a una concentración de 200 μ g/ml para PirA y un cultivo celular en medio 2XTY enriquecido con 0.1% de glucosa y kanamicina a una concentración de 50 μ g/ml para PirB. La densidad óptica de los cultivos oscilaba entre 0.6-0.8. Se tomó una alícuota del cultivo sin IPTG como control negativo. Las condiciones de expresión se muestran en la **Tabla 4**. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 500 μ l, se centrifugaron por 3 min a 10,000 x g, se retiró sobrenadante y se agregaron 200 ml de regulador de Laemmli. Las muestras fueron calentadas por 10 minutos a 95°C y se realizó electroforesis en gel de acrilamida al 10% para PirB y 15% para PirA.

Tabla 4. Condiciones de expresión para PirA y PirB.

Toxina	Temperatura	IPTG	Incubación
PirA	16°C	0.25, 0.5 y 1 mM	24 horas
PirB	30 y 16°C	1 mM	16 y 4 horas
	37°C	0.25, 0.5 y 1 mM	4 horas

6.2.2 Purificación en columna de níquel y cuantificación de proteína

Para la purificación de las proteínas se probaron una serie de condiciones, las cuales se resumen en la **Tabla 5**. Para obtener la fracción soluble, el botón celular de las clonas PirA se resuspendió en un regulador con 50 mM fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), 300 mM NaCl, 20 mM de imidazol a pH 8.0 mientras que para PirB el regulador contenía Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, Imidazol 20mM, DTT 1mM y sarcosyl 5%. Las células resuspendidas, se

sonicaron (COLE PARMER CPX130) con pulsos de 30 segundos por 10 minutos con amplitud de 40% para PirA y 3 pulsos de 30 segundos con amplitud de 100% para PirB. La centrifugación se realizó a 13,500 x g por 15 minutos. La fracción soluble se filtró con un filtro de 0.45 µm y se aplicó a una columna de afinidad a níquel (GE Healthcare). El lavado de columna se realizó con regulador 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl con un gradiente de imidazol de 20-500 mM a pH 8.0 en un ÄKTA pure 25L (GE Healthcare) para PirA. Para PirB el lavado de columna se hizo con regulador de fosfatos (PBS) con gradiente de imidazol de 10-500 mM. La cuantificación de proteínas se hizo con el kit de Ácido Bicinconínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit).

6.3 Ensayos de interacción proteína-proteína con PirAB y proteínas de hepatopáncreas de camarón

6.3.1 Preparación y cuantificación de proteínas de hepatopáncreas

Camarones en etapa juvenil de aproximadamente 2 g fueron obtenidos del laboratorio comercial Larvas Granmar S.A. de C.V. y fueron transportados al laboratorio y aclimatados durante una semana en acuarios de 50 L equipados con aireación y control de temperatura y fueron alimentados con formula comercial. Para el experimento fueron mantenidos en inanición por 24 h y posteriormente fueron disecados para extraer el hepatopáncreas. Un total de 2 g de tejido fresco (proveniente de 20 camarones) se resuspendió en 18 ml de regulador A frío (300 mM manitol, 5 mM EGTA, 17 mM HCl, pH 7.5) a 4 °C, el tejido se homogeneizó mediante disruptor (DRAGONLAB D-160). Y se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Lowry *et al.*, 1951.

Tabla 5. Condiciones de prueba para la purificación de PirA y PirB.

PirA				
Regulador	Concentración	pH	NaCl	pH final
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	20 mM	ND	100 mM	7.0
Fosfato de sodio monobásico	50 mM + 20 mM de imidazol	ND	300 mM	8.0
PirB				
Regulador	Concentración	pH	NaCl	pH final
Fosfatos	20 mM	7.0	500 mM	ND
Tris-base	20 mM	8.0	300 mM	ND
MOPS	20 mM	7.5	300 mM	ND
Tris-HCl	20 mM	8.0	500 mM	ND
Fosfato de sodio dibásico + ácido cítrico	20 mM	6.6	300 mM	ND
Pipes	20 mM	7.5	300 mM	ND
Fosfato de sodio monobásico + imidazol	20 mM	ND	500 mM	6.67
Fosfato de sodio monobásico	20 mM	ND	500 mM	7.0
TrisHCl, EDTA, imidazol, DTT y sarcosyl	10 mM 1 mM 20 mM 1 mM 5%	ND	150 mM	ND
Fosfatos, Imidazol	1X 10 mM	ND	-	ND

ND: No determinado

6.3.2 Marcaje de las proteínas PirA y PirB

Alícuotas de 200 μ l de PirA y PirB (a una concentración de 4.5 mg/ml) fueron incubadas con 5 μ l de biotina (éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron por una columna de Sephadex G25 (previamente lavada con regulador de fosfatos) y se centrifugó a 2,000 x g por 2 minutos. Una vez marcada la proteína, se corroboró el marcaje transfiriendo las proteínas del gel de acrilamida a membrana de PVDF (membrana de polifluoruro de vinilideno). La membrana se lavó con PBS por 10 minutos, se hicieron 2 lavados con de PBS-Tween 20 al 0.1% por 15 minutos y se bloqueó con de PBS-Tween 20 al 2% por 20 minutos, se lavaron con PBS-Tween por 15 minutos, se incubaron con SAPO-HRP (Estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano, dilución 1: 30,000) por 1 hora. Finalmente, las membranas se lavaron con PBS por 10 minutos y se revelaron con luminol en Quimioluminiscencia. Todos los lavados se hicieron con agitación en volumen de 25 ml.

6.3.3 Evaluación de la interacción entre PirA y PirB.

En un gel de acrilamida al 15% se aplicaron 0.5 y 2.0 μ g de la proteína PirA, se corrieron a 120 mV en regulador Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, 25 mM glicina y 0.1% de SDS) y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF. Para la detección de la marca con biotina, se lavó la membrana con regulador de PBS por 10 minutos, se hizo un lavado con PBS-Tween 20 al 0.1% por 15 minutos. Se incubó por 1 hora con PBS-BSA 1% para bloquear la membrana, se lavó con PBS-Tween 2 veces por 15 minutos, se incubó 1 hora con PirB marcada con biotina a una concentración de 50 nM en PBS-Tween. La membrana se enjuagó 2 veces con PBS-Tween y se lavó con PBS-Tween por 15 minutos. Posteriormente se incubó 1 hora con SAPO-HRP (dilución 1:30,000 en PBS-Tween), se enjuago 3 veces y se lavó por 15 minutos con PBS-Tween. Finalmente se lavó con PBS por 10 minutos y se reveló con luminol el cual emite luz azul y se detecta por medio de la quimioluminiscencia al agregar un agente oxidante (la peroxidasa acoplada a la estreptavidina).

6.3.4 Evaluación de la interacción de las proteínas recombinantes PirA y PirB con proteínas hepatopancreáticas

En un gel de acrilamida al 10% se corrieron diferentes concentraciones (5, 10, 25 y 50 μg) de las proteínas de hepatopáncreas, posteriormente fueron transferidas a membrana de PVDF (como se describió previamente). Y se siguió el protocolo para la detección de las proteínas marcadas descrito previamente (sección 6.3.2). Para ello, las proteínas se incubaron con PirA y PirB marcadas con biotina a una concentración de 30 nM y se determinó que existía interacción proteína-proteína mediante Quimioluminiscencia.

6.3.5 Evaluación de la especificidad de la interacción proteína-proteína

Se hicieron diluciones seriadas de las proteínas de hepatopáncreas comenzando con 25 μg en un volumen de 40 μl de PBS. Las muestras diluidas se corrieron en un gel de acrilamida al 10% y fueron transferidas a membrana de PVDF como se describió previamente. La membrana se incubó con la toxina PirB (previamente marcada) a una concentración de 30 nM y la interacción se reveló con el protocolo de detección de la sección 6.3.2.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de secuencias de los genes codificantes de PirA y PirB de diferentes cepas VP_{AHPND}.

7.1.1 Plásmidos aislados

Un total de 28 cepas; además de la cepa control, fueron usadas para el aislamiento de plásmidos. En la **Figura 1**, se observa el perfil de plásmidos de cada una de las cepas en un gel de agarosa al 1% teñido con el fluorocromo GelRed (Biotium).

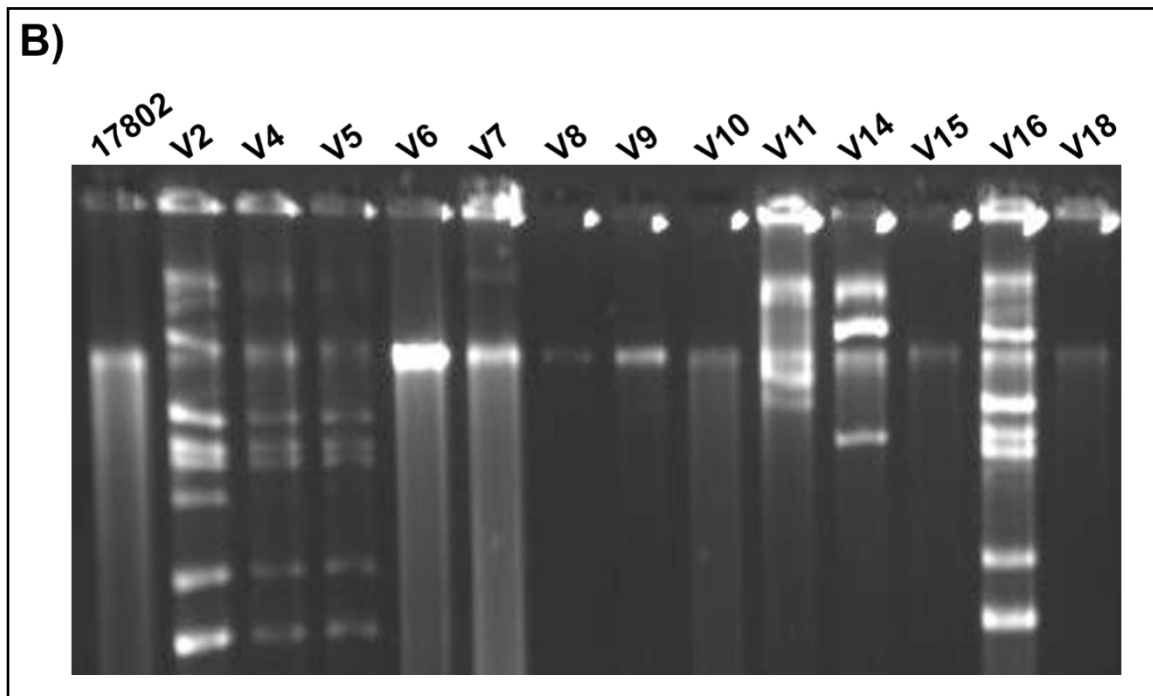
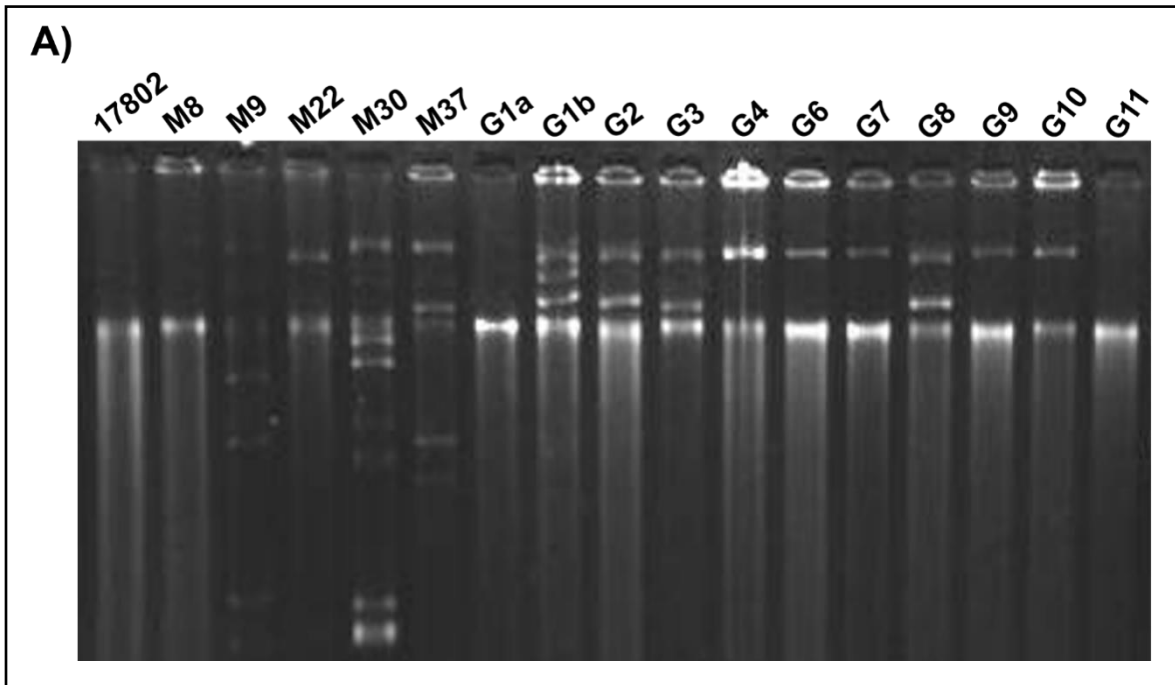


Figura 1. Gel de electroforesis del aislamiento de plásmidos. A) Plásmidos de cepas aisladas en Sinaloa (M) y Baja California Sur (G); B) Plásmidos de cepas aisladas en Baja California Sur (V). Cepa control *V. parahaemolyticus* (17802).

7.1.2 Evaluación de la presencia de los genes PirA y PirB

En la detección de los genes, se observa que 18 de las 29 cepas fueron positivas a la presencia de ambos genes (PirA y PirB), 4 cepas sólo poseen el gen de PirA y 7 sólo poseen el gen de PirB. En la **Tabla 6** se muestran los resultados de este análisis.

Tabla 6. Identificación de cepas Vp_{AHPND}.

No.	Cepa	PirA	PirB	No.	Cepa	PirA	PirB
1	17802	-	-	16	G10	+	+
2	M8	+	+	17	G11	-	+
3	M9	+	+	18	V2	+	+
4	M22	+	+	19	V4	+	+
5	M30	-	+	20	V5	+	+
6	M37	+	+	21	V6	-	+
7	G1a	-	+	22	V7	-	+
8	G1b	+	+	23	V8	+	+
9	G2	+	+	24	V9	+	+
10	G3	+	+	25	V10	+	-
11	G4	-	+	26	V11	+	-
12	G6	+	+	27	V14	+	-
13	G7	+	+	28	V15	+	-
14	G8	+	+	29	V16	+	+
15	G9	+	+	30	V18	-	+

*Los nombres marcados en negritas corresponden a cepas con ambos genes

7.1.3 Análisis de las secuencias de los genes PirA y PirB

En el alineamiento de las secuencias de PirA y PirB reportadas en el GenBank (Gene Name: PirB 20494510 y PirA 20494509) con las secuencias de las cepas en estudio, se observa que éstas son iguales (**Anexo 1**). En la **Tabla 7** se resume el porcentaje de identidad de dicho alineamiento.

Tabla 7. Identidad de la secuencia de los genes de PirA y PirB de cepas VP_{AHPND} aisladas en México con los genes reportados en la base de GenBank.

Alineamiento con PirA		Alineamiento con PirB	
Cepa	Porcentaje de identidad	Cepa	Porcentaje de identidad
M8	100%	M8	100%
M9	100%	M9	100%
M22	100%	M22	100%
M37	100%	M37	100%
G1b	100%	G1b	100%
G2	100%	G2	100%
G3	100%	G3	100%
G6	100%	G6	100%
G7	100%	G7	100%
G8	100%	G8	100%
G9	100%	G9	100%
G10	100%	G10	100%
V2	100%	V2	100%
V4	100%	V4	100%
V5	100%	V5	100%
V8	100%	V8	100%
V9	100%	V9	100%
V16	100%	V16	100%

7.1.4 Células DH5 α transformadas con los vectores recombinantes

En la transformación con el vector recombinante de PirB no se obtuvo crecimiento de colonias, mientras que un total de 15 colonias crecieron en la transformación con el vector recombinante de PirA con una eficiencia de transformación de 20.83 transformantes/ μ g. A estas colonias se les realizaron las 3 pruebas de confirmación.

7.1.5 Comprobación de clonas positivas de PirA: mediante PCR de colonia

En la **Figura 2** se muestra la imagen de un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, en donde se observa el producto de amplificación de PirA a partir de 15

colonias obtenidas de la ligación en el vector pGEM. La banda señalada con la flecha, indica una banda en la posición aproximada de 336 pb respecto al marcador de peso molecular (marcado como MP), la cual es el tamaño que corresponde al gen que codifica para PirA. Con esta primera verificación, se sugiere que el gen que codifica para PirA está presente en el vector recombinante con el cual fueron transformadas las células.

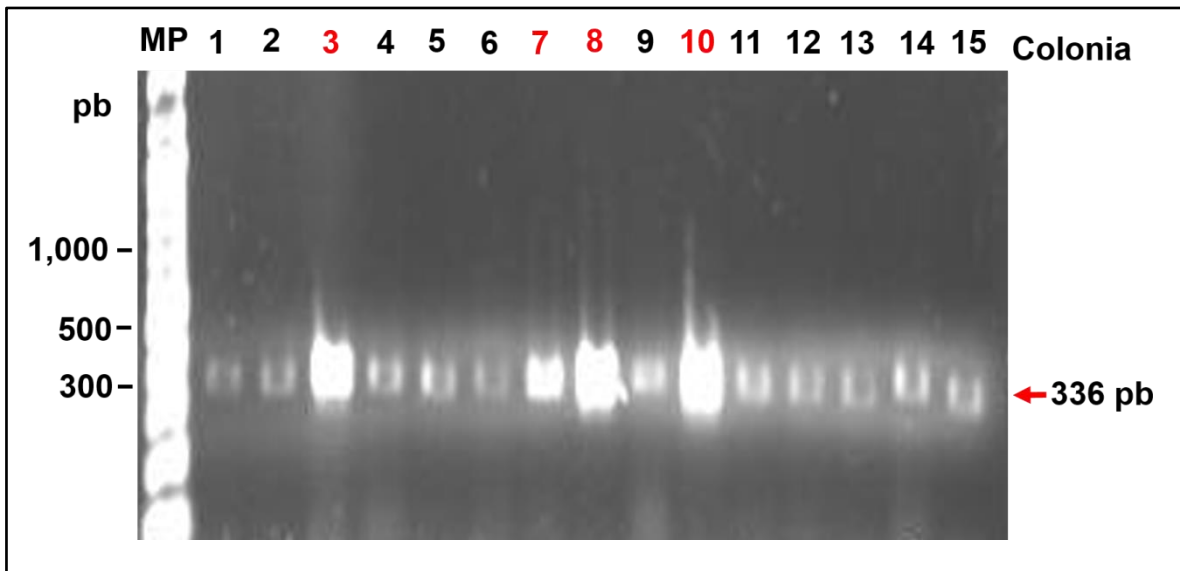


Figura 2. Productos de PCR de las colonias con el vector recombinante de PirA y pGEM. Los números en color rojo indican las colonias seleccionadas para la digestión con enzimas de restricción. La flecha roja indica la banda del gen de PirA.

7.1.6 Comprobación de clonas positivas de PirA: mediante doble digestión con enzimas de restricción

Con las colonias confirmadas mediante PCR (**Figura 2**) se seleccionaron las colonias 3, 7, 8 y 10 para el siguiente paso de confirmación, el cual fue doble digestión con enzimas de restricción. En la **Figura 3** se observa que únicamente a partir de las colonias 3, 8 y 10 se obtuvo un fragmento a la altura aproximada de 336 pb, el cual corresponde al tamaño de PirA. Con este resultado se confirma que el gen que codifica para PirA y que fue clonado en el vector pGEM, no presenta mutaciones en las regiones en las cuales cortan las enzimas de

restricción. Por ende, se consideró que la ligación del gen de PirA con el vector pGEM; al menos en las clonas 3, 8 y 10, no introdujo mutaciones en los sitios de restricción.

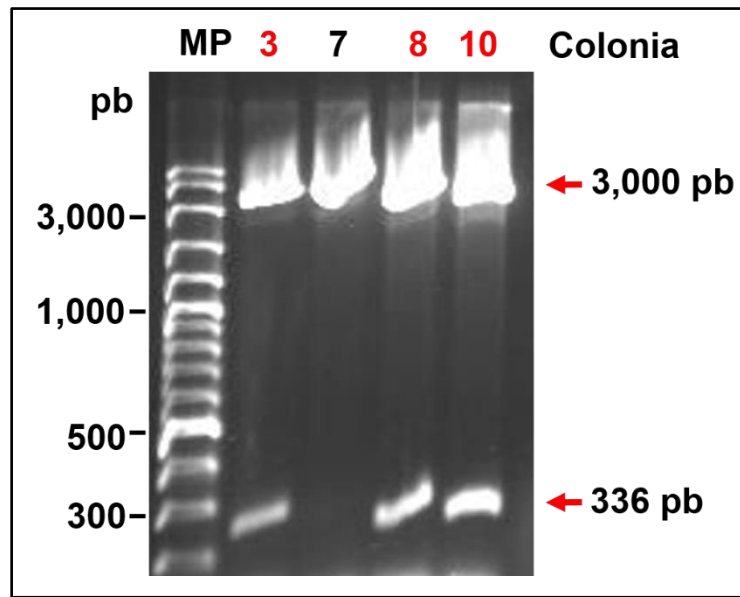


Figura 3. Doble digestión con enzimas de restricción del vector de las colonias positivas a la PCR de colonia. Los números en rojo indican el número de colonia cuyo vector liberó el gen de PirA, en negro el número de colonia cuyo vector no liberó el gen de PirA, la flecha en rojo a las 336 pb corresponde al gen de PirA liberado del vector, la flecha roja a la altura de 3,000 pb corresponde al vector pGEM linealizado.

Finalmente, los fragmentos de las colonias 3, 8 y 10 se enviaron a secuenciar. No obstante, los resultados de la secuenciación no fueron los que se esperaban para PirA, ya que como se observa en el **Anexo 2**, las secuencias de las clonas presentan una serie de mutaciones, así como inserciones.

Tras varios intentos para obtener los vectores recombinantes de PirA y PirB en pGEM, y en los cuales no se tuvo éxito, se decidió enviar a sintetizar los genes de PirA y PirB clonados en vectores de expresión pColdI-PirA y pET28a-PirB a la empresa ADN sintético SAPI de CV. pColdI-PirA es un vector de expresión con promotor de choque frío *cspA* (proteína A de choque frío), cuya regulación está

mediada por el operon lac, posee etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y resistencia a ampicilina. pET28a-PirB posee el promotor T7, la expresión está regulada por el operón lac, posee etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal y resistencia a kanamicina. En la **Figura 4** se muestran los mapas de los vectores.

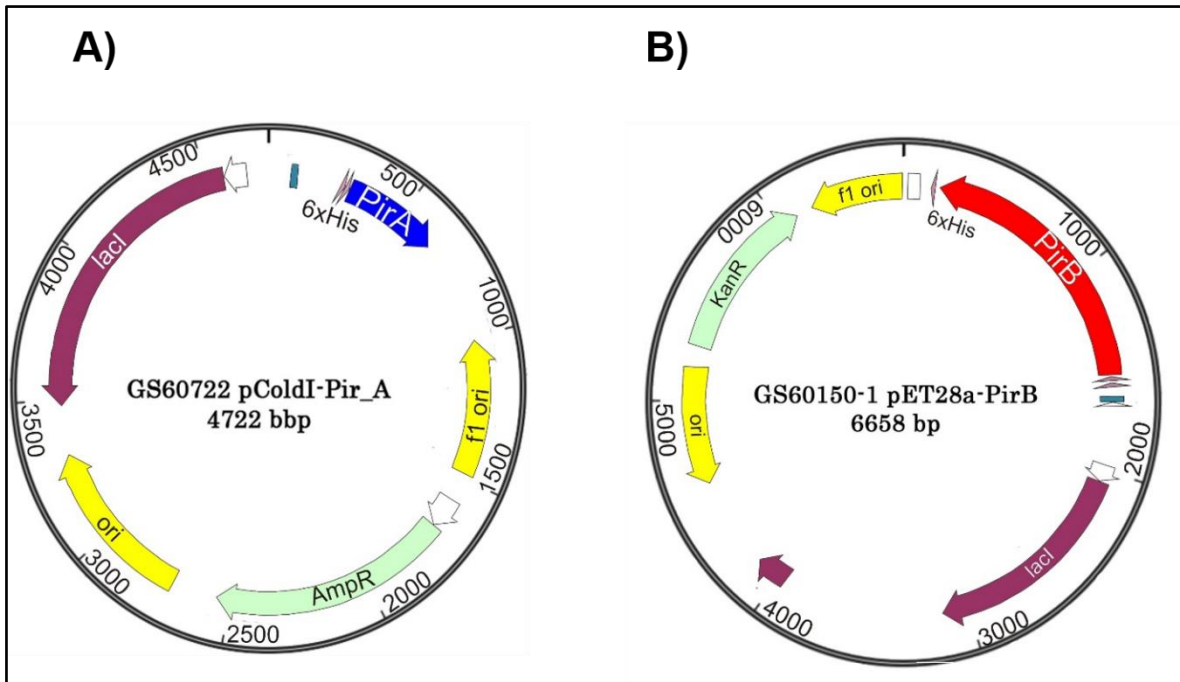


Figura 4. Vectores de expresión recombinante: A) Vector recombinante con el gen que codifica para la toxina PirA, la flecha azul indica el gen de PirA; B) Vector recombinante con el gen que codifica para la toxina PirB la flecha roja indica el gen de PirB.

7.1.7 Transformación de células BL21 con los vectores recombinantes de PirA y PirB

En placas de Petri con medio LB + Ampicilina a una concentración final de 200 µg/ml se observó crecimiento de colonias con el vector recombinante de PirA así como en el medio LB+kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml con el vector recombinante de PirB. Esto sugiere que el vector recombinante está transformado en las células BL21. Dichas transformantes fueron empleadas para las pruebas de expresión.

7.2 Purificación y expresión de las toxinas recombinantes PirA y PirB

7.2.1 Expresión de las toxinas

Las condiciones de expresión para PirA donde se observaron los mejores resultados fueron a una concentración de 1mM de IPTG, a una temperatura de 16°C con un período de incubación de 24 horas. En dichas condiciones se observó una banda intensa a la altura aproximada de 14 KDa (**Figura 5A**), la cual corresponde al peso de PirA, mientras que para PirB se realizó la expresión a 30°C por un período de incubación de 4 horas con una concentración de 1mM de IPTG, en donde se observa una banda intensa a la altura aproximada de 50 KDa, peso que corresponde a PirB (**Figura 5B**).

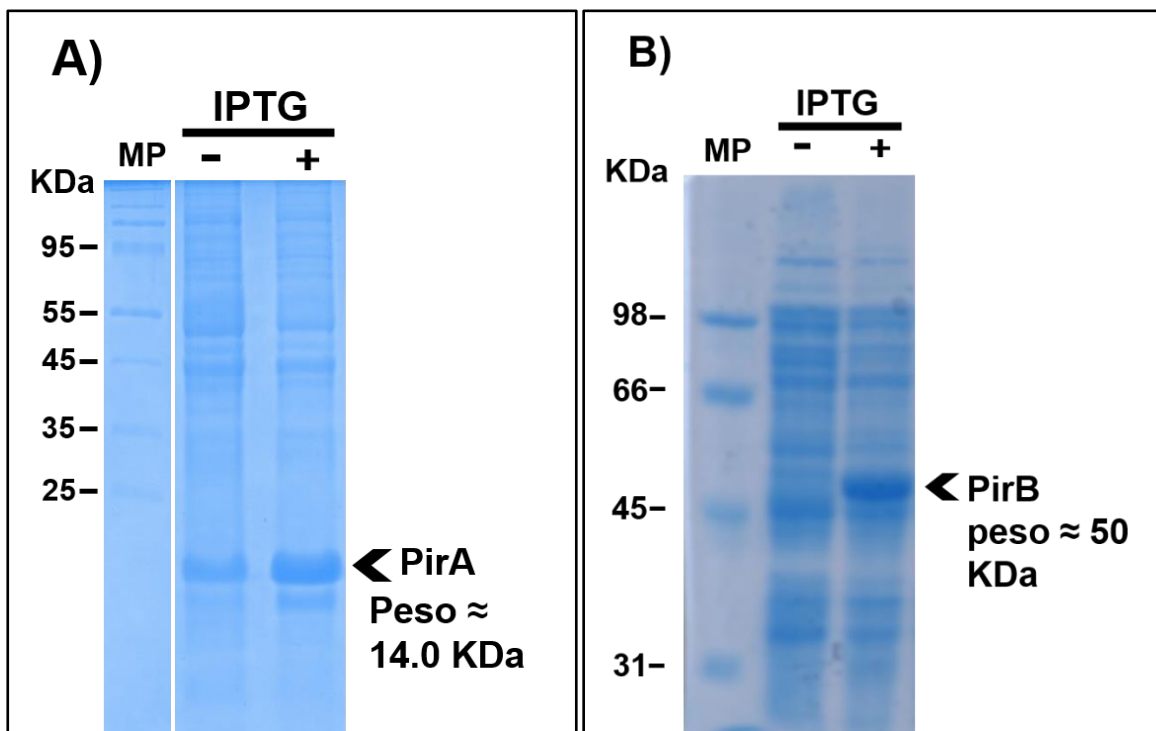


Figura 5.A) Expresión de la toxina PirA; **B)** Expresión de la toxina PirB. La flecha indica la banda de expresión de ambas proteínas.

7.2.2 Purificación de la toxina PirA

La **Figura 6A** corresponde a la purificación de PirA con NaH_2PO_4 50 mM, imidazol 20 mM y NaCl 300 mM, en donde se observa una única banda intensa que se encuentra a la altura del peso aproximado de la proteína PirA (14 KDa). Para confirmar que dicha banda corresponde a PirA, se enviaron muestras para su detección por Western blot (**Figura 6B**) de las fracciones E2 y E3 (elución 2, 200 mM de imidazol y elución 3, 265 mM de imidazol). Es posible observar una banda a la altura del peso aproximado correspondiente a PirA, con la cual se confirma la presencia de dicha proteína. La prueba de Western Blot se realizó en el laboratorio del Dr. Mario Soberón del Instituto de Biotecnología de la UNAM con la asesoría de la Dra. Isabel Gómez Gómez.

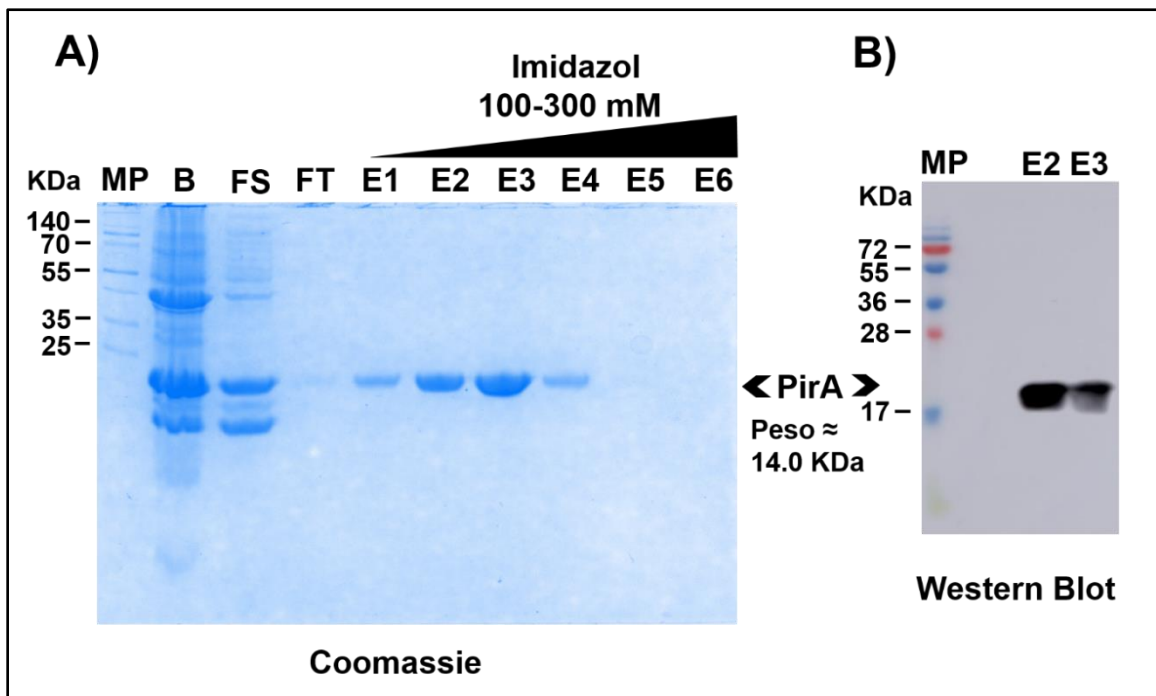


Figura 6. A) Purificación de la toxina recombinante PirA; B: botón, FS: fracción soluble, FT: fracción soluble filtrada, E: elución. La flecha indica la banda de la proteína PirA purificada; B) Membrana de PDVF con las eluciones 2 y 3 en la prueba de Western Blot con anticuerpos anti-Histidinas. La flecha indica la banda de la proteína PirA detectada mediante anticuerpos anti-Histidinas.

7.2.3 Purificación de la toxina PirB

En la **Figura 7A** se muestra la purificación de la toxina PirB, en la cual se utilizó el regulador de lisis Tris-HCl 10mM, EDTA1mM, NaCl 150 mM, imidazol 20mM, DTT 1mM y sarcosyl 5%. La banda que se observa a la altura aproximada de 50 KDa correspondiente a PirB se obtuvo con PBS + 100 mM de imidazol. En la prueba de Western Blot (**Figura 7B**) se confirma la presencia de PirB en la cual se puede apreciar una banda a la altura aproximada de 50 KDa, confirmando así la presencia de dicha proteína.

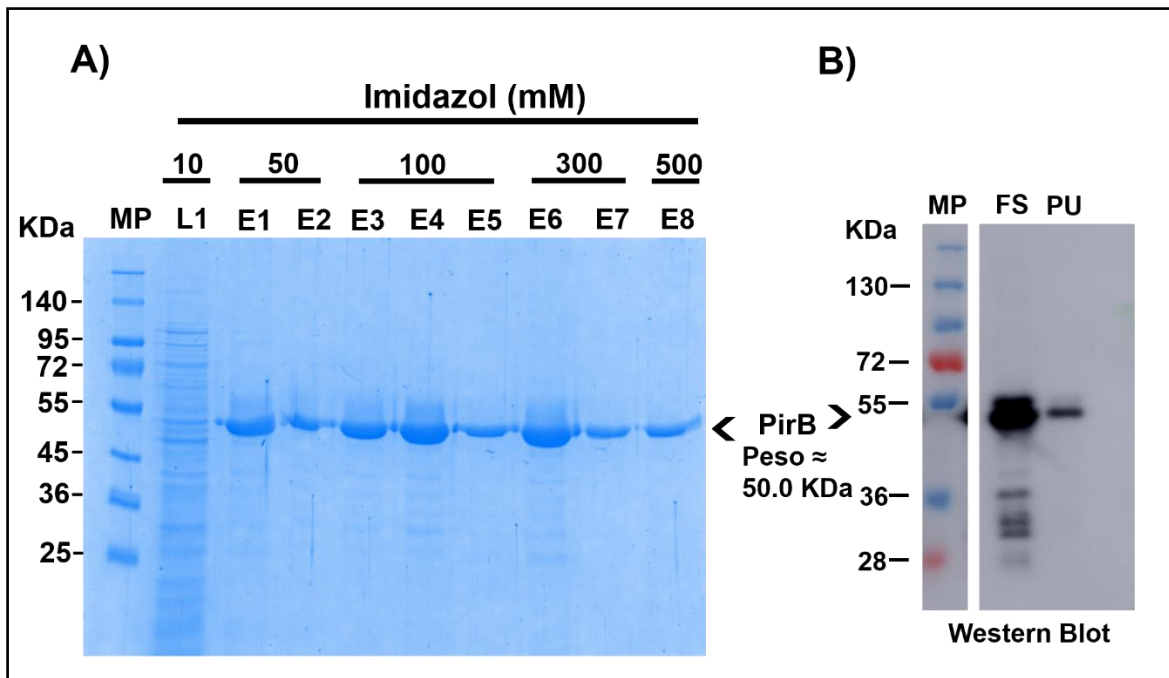


Figura 7. A) Purificación de la toxina recombinante PirB; MP: marcador de peso molecular, L1: lavado 1, E: elusión. La flecha indica la banda de la proteína PirB purificada; B) Membrana de PDVF con la fracción soluble (FS) y la proteína purificada (PU) en la prueba de Western Blot con anticuerpos anti-Histidinas. La flecha indica la banda de la proteína PirB detectada mediante anticuerpos anti-Histidinas.

7.3 Ensayos de interacción proteína-proteína con PirAB y proteínas de camarón

7.3.1 Proteínas PirA y PirB marcadas con biotina

En la **Figura 8** se observa la banda que corresponde a PirA y PirB marcadas con biotina, esto para realizar los ensayos de interacción proteína-proteína.

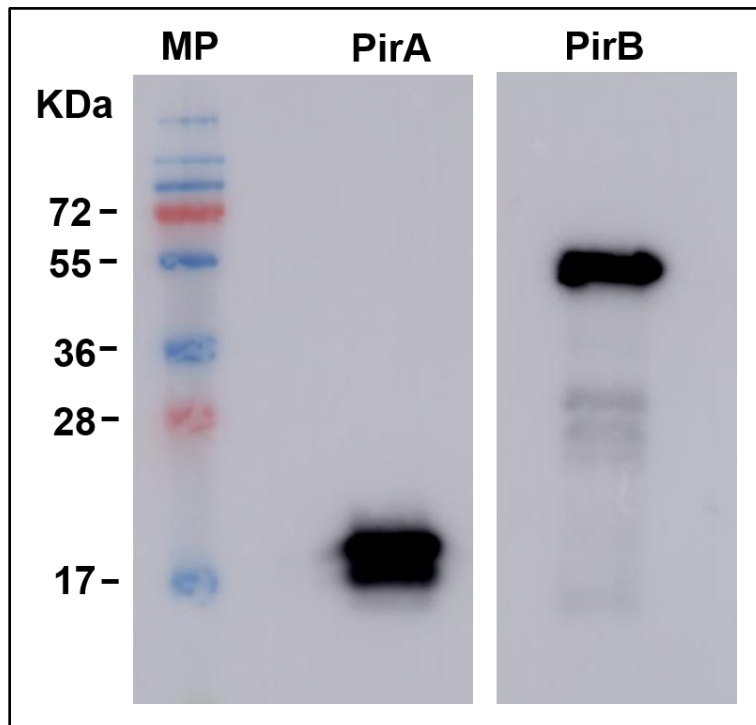


Figura 8. Representación de las proteínas biotinizadas: la banda de 14 kDa y 50 kDa corresponden a PirA y PirB respectivamente, marcadas con biotina.

7.3.2 Interacción entre PirA y PirB

Para comprobar la interacción entre ambas proteínas, se realizó una prueba de interacción entre PirA y PirB, en la **Figura 9** se observa que al incubar PirA con PirB marcada se obtuvo una banda a la altura aproximada de 14 kDa que

correspondía al peso de PirA, cuya proteína estaba inmovilizada en la membrana de PVDF. Del mismo modo, al incubar PirB con PirA marcada, se obtuvo una banda a la altura aproximada de 50 kDa cuyo peso corresponde a PirB. Con esto se confirmó la interacción entre ambas proteínas. La banda que se obtuvo fue por la señal de la biotina de la proteína marcada; es decir, si la proteína no interaccionaba, no se emitiría señal con el luminol y no se apreciaría la banda.

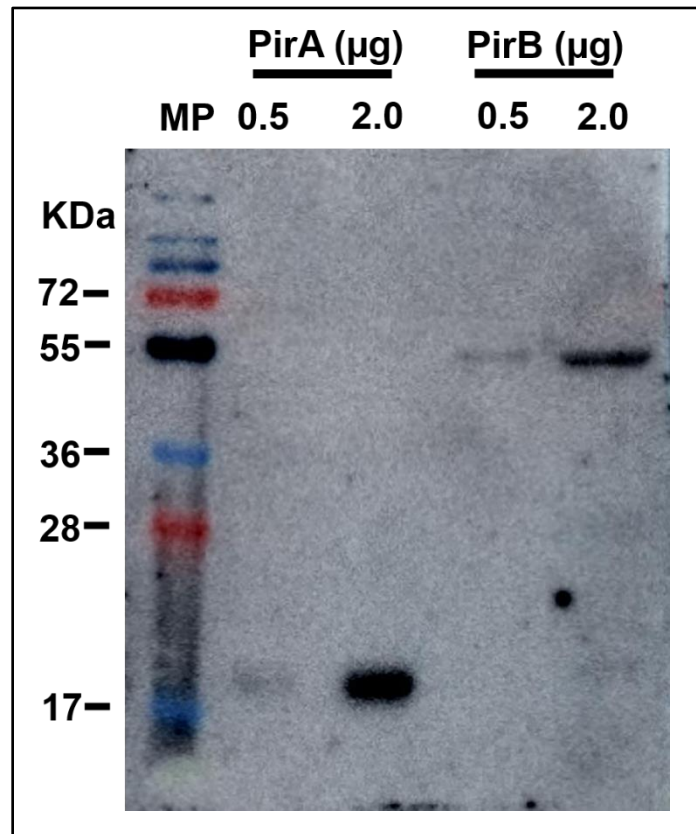


Figura 9. Representación de la interacción entre PirA y PirB. Las dos primeras bandas en aproximadamente 14kDa corresponden a PirA en concentraciones de 0.5 y 2.0 µg interaccionando con PirB, las bandas en 50kDa corresponden a PirB en concentraciones de 0.5 y 2.0 µg interaccionando con PirA.

7.3.3 Interacciones proteína-proteína

Las proteínas de hepatopáncreas se incubaron con las proteínas PirA y PirB marcadas, y mediante quimioluminiscencia se detectaron las interacciones. Para

el caso PirB, como se observa en la **Figura 10**, se observó una banda a la altura de entre 50 kDa y 55 kDa, que indica una interacción proteína-proteína, mientras que para PirA no se observó ningún tipo de interacción.

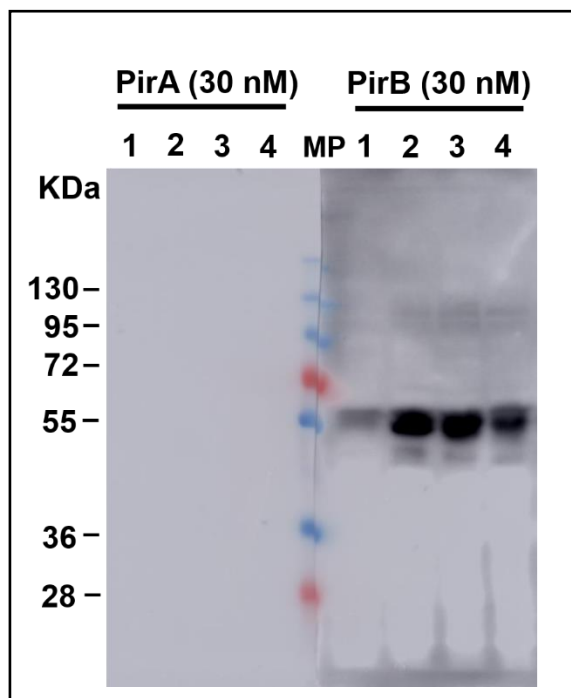


Figura 10. Interacciones de PirA y PirB con las proteínas de hepatopáncreas de camarón; MP: marcador de peso molecular, el número en cada carril indica el hepatopáncreas (1-4) del camarón con el que se realizó la prueba. En la prueba con PirB la banda de 50kDa aproximadamente en los carriles 1-4, indica la interacción entre la(s) proteína(s) del hepatopáncreas con la toxina PirB.

7.3.4 Especificidad de la interacción proteína-proteína

En la **Figura 11** se muestran los resultados de la prueba de especificidad donde se observa que, a mayor cantidad de proteínas de hepatopáncreas, la intensidad de la banda es mayor, lo cual es indicativo de la especificidad que tiene PirB al unirse a esa proteína(s).

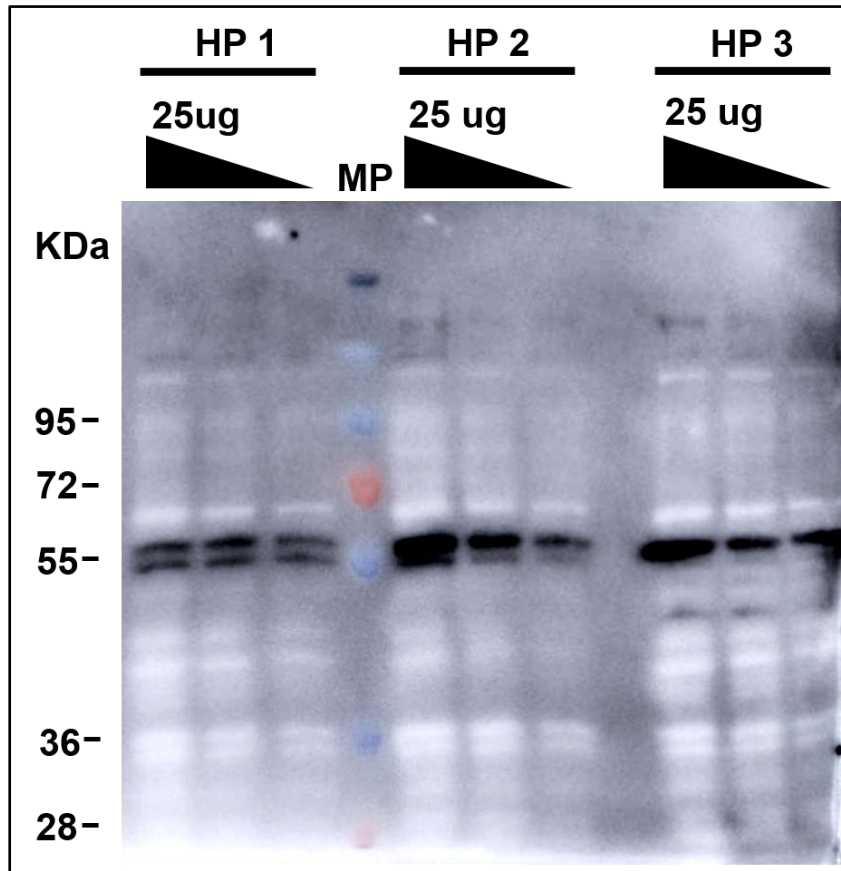


Figura 11. Unión específica de PirB con las proteínas de hepatopáncreas; MP: marcador de peso molecular, la banda de 50 kDa aproximadamente, indica la interacción entre la(s) proteína(s) del hepatopáncreas con la toxina PirB marcada con biotina, cuya concentración inicial es de 25 µg en las tres muestras (hepatopáncreas).

8. DISCUSIÓN

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal que poseen las bacterias, tienen la capacidad de codificar enzimas que benefician a ésta. Entre estas enzimas se encuentran algunas relacionadas con la resistencia a antibióticos, la degradación de compuestos orgánicos complejos y la producción de toxinas (Sambrook y Russell 2001). En las cepas de VP_{AHPND} se han identificado de 1 a 5 plásmidos extracromosomales (Lee *et al.*, 2015). En el presente estudio se encontraron resultados similares (**Figura 1**), ya que al menos uno de los cinco plásmidos extracromosomales reportados está presente en cada una de las cepas. En este sentido, en la cepa de *V. parahaemolyticus* de referencia (ATCC 17802), la cual fue tomada como control negativo en este trabajo, está presente una banda constante, lo que sugiere que la cepa tiene el plásmido pVA1, pero no los genes que codifican para PirA y PirB. Un ejemplo de ello es la cepa de *V. parahaemolyticus* M2-36 (Lee *et al.*, 2015), que fue aislada en Vietnam de un brote de AHPND. Esto puede ser resultado de una transferencia horizontal entre microorganismos, tal es el caso de una cepa de *Vibrio campbellii* la cual posee los genes de la toxina PirAB y que es capaz de producir los signos de la AHPND (Kondo *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017). A pesar de ello, en estudios realizados en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN), se diseñaron oligonucleótidos para la detección del cromosoma 2 y el plásmido pVA1 de *V. parahaemolyticus*, en conjunto con los oligonucleótidos para la detección del gen de PirA. A partir de ello, se realizó una Multiplex PCR esto con la finalidad de detectar un fragmento del cromosoma 2 de *V. parahaemolyticus*, el plásmido pVA1 y además el gen que codifica para PirA. En este análisis se observa que la cepa 17802 de *V. parahemolyticus* únicamente amplifica el fragmento que corresponde al cromosoma 2 (Carrillo-Méndez, 2017). Lo anterior es un indicativo de que el plásmido que se observa en la cepa no corresponde al plásmido pVA1, sino que se trata de otro tipo de plásmido que está presente en la cepa.

El 62% de las cepas de *V. parahaemolyticus* (18 cepas en total) que fueron aisladas de brotes de AHPND en Baja California Sur y Sinaloa dieron positivo a la presencia de los genes PirA y PirB, con una banda a la altura de 336 pb que corresponde al gen que codifica para PirA y una segunda banda a la altura de 1,317 pb que corresponde al gen codificante para PirB, estos resultados son similares a los reportados por Lee *et al.* (2015) en el análisis de cepas V_{pAHPND} . Sin embargo, algunas de las cepas dieron positivo en PirA mientras que para PirB dieron negativo. Lo anterior posiblemente se debe a que algunas cepas poseen sólo alguno de los genes de la toxina o parte de ellos, un ejemplo de ello es para la cepa FIMS1708+ que fue aislada en México y en la cual únicamente se encontró el 90% del gen que codifica para PirB, mientras que el gen de PirA estaba ausente (Tinwongger *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2015b).

Los análisis sobre la detección de cepas V_{pAHPND} demostraron la ausencia de uno de los genes PirA o PirB lo cual puede ser atribuido a la ubicación de los sitios de reconocimiento a transposasas que posee el plásmido pVA1. Dichos sitios se encuentran en los extremos donde están situados los genes de PirA y PirB lo que permite la transferencia horizontal de dichos genes. Lee *et al.* (2015) sugiere un fenómeno similar en una comparación de plásmidos de cepas AHPND positivas y una cepa aislada de un brote de AHPND en la cual tenía el plásmido pVA1, pero no los genes que codifican para la toxina binaria PirAB. Una estrategia de verificación es a través de qPCR, la cual puede permitir corroborar la presencia y/o ausencia de un gen y su abundancia, debido a que esta técnica implicaría realizar una curva de disociación la cual mostraría la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperados. Además, se hace uso de genes de referencia para la obtención de datos más fiables (Pryor & Wittwer, 2006). Por otro lado, en el alineamiento de las secuencias de PirA y PirB con las secuencias reportadas en el GenBank no se observan diferencias entre las secuencias, es decir, en ambas se encontraron la misma cantidad de pares de bases (PirA=336 pb, PirB=1317 pb) así como que cada uno de los nucleótidos de las secuencias son iguales.

En la década de 70's se desarrollaron las primeras técnicas del ADN recombinante, la cual permite obtener moléculas de ADN recombinante específicas para su posterior estudio (Poutou, 2009), dentro de estas técnicas se implica la clonación de ADN foráneo en vectores de expresión. De acuerdo a lo reportado por Sambrook & Russell (2001), algunos de los problemas que pueden suscitarse durante la clonación de ADN en vectores pueden ser debido al método de purificación de los productos de PCR, en donde las polimerasas termoestables son resistentes a estos métodos. La presencia de la ADN polimerasa y dNTP's residuales, extenderían los fragmentos faltantes por la digestión de las enzimas de restricción, lo que impediría la adaptación de los productos de PCR para la clonación. Lo anterior pudo haber ocurrido en este estudio, impidiendo la clonación del gen de PirA y PirB en los vectores de expresión, esto coincide parcialmente con lo reportado por Sambrook & Russell (2001). Además se ha sugerido que entre más extensa sea la secuencia de ADN que se pretende clonar, más difícil será amplificar los fragmentos completos de PCR, lo cual dificulta aún más la clonación (Poutou, 2009).

Otro de los problemas que se puede presentar es durante la secuenciación del fragmento de interés. Tal fue nuestro caso al secuenciar el ADN del vector recombinante, la secuencia presentaba una serie de inserciones, mutaciones y deleciones, de acuerdo a lo reportado por Sambrook & Russell, 2001 puede deberse a problemas en la calidad del ADN ya que aun realizando la purificación con kit, ciertas impurezas como dímeros formados por los oligonucleótidos pueden permanecer aún después de la purificación. Por lo tanto, afectan el proceso de la secuenciación uniéndose a los oligonucleótidos utilizados durante dicho proceso. La calidad del ADN también depende del proceso de purificación en donde se puede presentar contaminaciones por ARN, etanol y sales que afectan la procesividad de la ADN polimerasa. La cantidad del ADN es otro problema en la secuenciación, una cantidad insuficiente, entre otras cosas puede producir problemas de unión de los oligonucleótidos a la secuencia blanco, así como una baja procesividad de la polimerasa. Para evitar este tipo de errores, se recomienda

que el ADN sea cuantificado mediante electroforesis, haciendo diluciones y comparando con marcadores (Sambrook & Russell 2001).

Un paso previo a la purificación de proteínas para cualquier estudio bioquímico implica su expresión. La expresión de proteínas es el proceso en el cual se agrega una molécula llamada “inductor”, la cual se une al represor (proteína que impide que la ARN polimerasa transcriba la secuencia que se traduce la proteína de interés) desprendiéndose este de la cadena de ADN, permitiendo así que la polimerasa transcriba el mRNA que se traduce a la proteína blanco. La expresión permite obtener la proteína de interés en grandes cantidades para posteriormente purificarla. La purificación de la proteína tiene como objetivo concentrarla de manera diferencial. El método de purificación debe diseñarse tomando en cuenta varios factores, entre ellos, un regulador fuerte para que éste contribuya con la lisis de las células. La cantidad de cloruro de sodio es un factor importante para mantener la solubilidad y estabilidad de la proteína, así como monitorear el pH el cual deberá estar una unidad por encima o por debajo del punto isoeléctrico de la proteína para lograr la ionización de ésta evitando así la precipitación (Sambrook & Russell 2001; Gräslund *et al.*, 2008). En el presente trabajo se estandarizaron condiciones de expresión y purificación de las proteínas PirA y PirB, diferentes a las ya reportadas por Lee *et al.* (2015) y Trujillo-García (2016). Esto se debe a que las proteínas de interés se encontraban en vectores de expresión diferentes a los reportados, es decir, pColdI-PirA y pET28a-PirB, mientras que en los reportados para PirA se encontraban en pET28a y pET21b, mientras que PirB en pET21b y pET32a. Esto hace que las condiciones de expresión de las proteínas difiera, tal es el caso para pColdI-PirA, ya que para el sistema pColdI la expresión de la proteína blanco se da con el uso de la tecnología de “choque en frío” es decir, al activar la proteína de choque frío *cspA* (*cspA*, por sus siglas en inglés) se liberan elementos que han sido incorporados en éste vector para regular la producción de la proteína blanco a temperaturas de incubación relativamente bajas (15-16°C). A estas temperaturas también se suprime la expresión de otras proteínas y se detiene temporalmente el crecimiento celular, lo cual permite la expresión de la proteína con un alto rendimiento y

solubilidad (pCold system manual). Por lo que la temperatura óptima de inducción para PirA fue a 16°C. En este sentido, si bien el sistema entre los vectores pET21b y pET28a difieren únicamente en el gen de resistencia (pET system manual), las condiciones de expresión de la proteína blanco en estos vectores fueron muy diferentes en cuanto a la temperatura y expresión (pET21b a 16°C y pET28a a 30°), la cual puede interferir directamente en el plegamiento de la proteína. Como ya se mencionó, al reducir la temperatura se detiene temporalmente el crecimiento celular dando pauta a un mayor tiempo para el plegamiento de la proteína. Este cambio en las condiciones de plegamiento podría conllevar a que elementos importantes de la proteína de interés como la etiqueta de histidinas, pudiesen quedar ocultas, lo cual modifica totalmente las condiciones de purificación de la proteína. Por lo cual fue necesario estandarizar las condiciones de expresión y por consiguiente, las condiciones de purificación de las proteínas PirA y PirB.

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa o PVDF es una técnica utilizada para el estudio de las interacciones proteína-proteína, en la cual se fraccionan las proteínas en geles de SDS-PAGE y éstas se transfieren a la membrana la cual se incuba con la muestra de interés. Las muestras son típicamente proteínas que han sido radiomarcadas o biotiniladas las cuales pueden ser detectadas mediante autoradiografía (si la prueba esta radiomarcada) o estreptavidina (si la proteína está biotinilada). Como ya se mencionó antes, esta es una técnica que requiere la desnaturalización de las proteínas mediante el fraccionamiento en gel de SDS-PAGE, por lo que pudiera parecer poco probable que pocas o ninguna interacción entre proteínas pudiera darse ya que la mayoría de estas interacciones dependen de aspectos de la estructura secundaria de las proteínas. Sin embargo, se sabe que muchos tipos de interacción proteína-proteína siguen produciéndose aún después de que una de las muestras en la interacción esta desnaturalizada (Hall, 2004). Con base en esto, la técnica es muy utilizada en el estudio de interacciones entre proteínas, tal es el caso de Cry con los receptores a los cuales se une. Onofre *et al.* (2017) identificó la aminopeptidasa-N2 como receptor de la toxina Cry2Ab de *B. thuringensis* en *M.*

sexta, así como Knight *et al.* (1994) quienes realizaron uno de los primeros estudios en la identificación de los receptores de la toxina Cry con esta técnica, en dónde identificaron como receptor una APN para la toxina CryIA(c) en *M. sexta*. Siendo Cry la proteína con la cual PirAB tiene alta homología estructural, se utilizó la técnica antes mencionada para determinar la interacción entre PirAB con las proteínas del hepatopáncreas del camarón, las cuales actúan como posibles receptores de unión. En la prueba con PirB se observa una banda que hace referencia a la interacción de PirB con una proteína del hepatopáncreas del camarón, además dicha interacción según la prueba de especificidad se trata de una interacción específica.

Los resultados obtenidos con PirB son congruentes según los estudios de homología estructural reportados en la literatura (Lee *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017), en el cual se observa que el dominio C-terminal de PirB puede emular al dominio II de Cry. Según este modelo estructural, el dominio II contiene un plegamiento del tipo inmunoglobulina que está involucrado en interacciones proteína-proteína, por lo tanto, para el caso de PirB éste estaría actuando no sólo como formador de poro sino también como de unión a receptor (Lin *et al.*, 2017). Con todo ello se puede afirmar que la técnica de interacción proteína-proteína utilizada en Cry es funcional para la determinación de la interacción entre PirB y las proteínas de hepatopáncreas de camarón, lo cual podría permitir identificar los receptores de unión de dicha proteína.

Según el estudio realizado por Lin *et al.* (2017) sobre la similitud estructural de PirA con Cry donde se ha observado que la toxina posee un plegamiento muy similar al del dominio III de Cry capaz de unirse al azúcar N-acetilgalactosamina de la APN, se esperaba obtener interacciones proteína-proteína con PirA, sin embargo, en este caso no se lograron observar dichas interacciones. Esto se pudo deber a que, si bien la mayoría de las interacciones de las proteínas que fueron desnaturalizadas permanecen, algunas de las que se llegan a perder pudieron ser

críticas para este análisis con PirA, o bien que la fuerza de interacción entre PirA y las proteínas de hepatopáncreas no fue suficientemente fuerte para ser detectada. Por lo que sería recomendable probar otras condiciones en las que se puedan detectar interacciones proteína-proteína sin la desnaturalización de las mismas. Tal es el caso de Zhou *et al.* (2016) quién realizó pruebas de interacción proteína-proteína en agarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr), a partir de ello logró identificar las proteínas de membrana a las cuales se une la toxina Cry1Ac en *Helicoverpa armígera*. Esta es una técnica en la que las proteínas de interés se inmovilizan en la agarosa CNBr y posteriormente se incuban con las proteínas del tejido blanco. Esta técnica al no requerir la desnaturalización de las proteínas blanco, la hace sea una excelente opción para evaluar las interacciones de PirA con las proteínas de hepatopáncreas de camarón.

En general, este tipo de estudios son importantes ya que nos permiten estudiar las interacciones entre proteínas, entre ellas tenemos la interacción entre PirA y PirB sugiriendo que dicha interacción es un paso importante en la identificación de los receptores de unión.

Si bien, las proteínas PirA y PirB de *Photorhabdus* fueron las primeras reportadas como toxinas potenciales y presentan una secuencia similar al dominio I de Cry, su mecanismo de acción no es claro, por lo que los estudios recientes sobre el mecanismo de acción de las toxinas PirA y PirB de *V. parahaemolyticus* ha sido relacionado con Cry cuyo mecanismo de acción ha sido descrito ampliamente.

Hacen falta realizar más estudios sobre el mecanismo de acción de PirAB, los cuales permitan conocer paso a paso su mecanismo de acción en la célula blanco, entre ellas tenemos la identificación de los receptores de unión de PirAB, a partir de los cuales se estarían generando ideas más claras sobre dicho mecanismo de acción.

9. CONCLUSIONES

Al analizar las secuencias de los genes codificantes de las toxinas PirA y PirB no se encontraron variantes, lo que sugiere que al elegir los genes de PirA y PirB de cualquier cepa se obtendrían resultados similares en las pruebas de interacción proteína-proteína.

Para lograr la expresión y la purificación de las toxinas (PirA y PirB) con un buen rendimiento, se estandarizaron las condiciones de inducción y purificación, dado que los vectores de expresión de las proteínas reportadas en la literatura se encontraban en vectores de expresión distintos a los empleados en este trabajo.

Mediante la técnica de interacción proteína-proteína se logró determinar la interacción entre PirB y proteínas de hepatopáncreas de camarón las cuales aparentemente actúan como receptores de unión, mientras que para PirA no se logró observar dicha interacción. La interacción entre PirA y PirB fue demostrada, sugiriendo que está es un paso importante en su mecanismo de acción.

Si bien existe homología estructural entre PirAB y Cry, sólo se logró extrapolar la técnica de interacción proteína-proteína con la toxina PirB, logrando observar la interacción con proteínas de hepatopáncreas de camarón. Por tanto, la hipótesis planteada se logró cumplir parcialmente.

PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis las perspectivas de trabajos futuros se orientan en complementar los aspectos en la descripción del mecanismo de acción de la toxina binaria PirAB. En concreto, se podrían estudiar métodos que permitan observar la interacción de PirA con las proteínas del hepatopáncreas de camarón, entre estos tenemos la interacción proteína-proteína en agarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr) la cual no requiere de la desnaturalización de una de las proteínas. En un segundo plano, se encontrarían los estudios para la mejora de las estrategias en el control de la AHPND con base en el conocimiento sobre el mecanismo de acción de la toxina, unos ejemplos de dichos estudios podrían ser enfocados en bloquear el receptor de la toxina mediante anticuerpos, así como bloquear la interacción entre la toxina PirA y PirB evitando la formación del complejo y por consecuencia la actividad de la toxina.

BIBLIOGRAFÍA

- Akazawa, N., & M. Eguchi. 2013. Environmental trigger for EMS/AHPNS identified in Agrobrest shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 16-17.
- Campa-Córdova, A. I., A. F. León-Gallo, A. Romero-Maldonado, A. C. Ibarra-Serrano, S. Rosales-Mendoza, I. Hirono & C. Angulo. 2017. Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, 1-5.
- Carrillo-Méndez G. J. 2017. Transformación Genética Natural de *Vibrioparahaemolyticus* como modelo de infección de sistemas acuícolas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. 70 pp.
- Chamberlain, G. 2013. EMS The Perfect Killer.
http://www.seafood.vasep.com.vn/Daily-News/53_8788/EMSThe-Perfect-KillerA-Webinar.htm. Fecha de consulta 23 de noviembre de 2017.
- D.O.F. 2012. Carta Nacional Pesquera 2012. Diario Oficial de la Federación, 24 Agosto 2012. México.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/153374/Carta-Nacional-Pesquera-2012.pdf>. Fecha de consulta 12 de agosto de 2017.
- Dong, X., H. Wang, G. Xie, P. Zou, C. Guo, Y. Liang & J. Huang. 2017. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the pir^{VP} gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging microbes & infections*, 6(1), e2.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia, 24 p.

- Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 433-442.
- Gerdes K., P.B.Rasmussen & S.Molin. 1986. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10): 3116–20.
- Gómez, I., I.Arenas, I.Benitez, J.Miranda-Ríos, B.Becerril, R.Grande, J.C. Almagro, A.Bravo & M.Soberón.2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34032-34039.
- Gräslund, S., P.Nordlund, J.Weigelt, J.Bray, O.Gileadi, S.Knapp & H. W. Park. 2008. Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135-146.
- Kondo, H., P. T.Van, L. T. Dang & I. Hirono. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome announcements*, 3(5), e00978-15.
- Krol, R.M., W.E.Hawkins & R.M. Overstreet. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of invertebrate pathology*, 57(3), 362-370.
- Han J.E., K.F.J.Tang, L.H. Tran & D.V. Lightner. 2015a. *Photorhabdus* insect related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the

causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113: 33-40.

Han, J. E., K. F. Tang & D. V. Lightner. 2015b. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 115(3), 245-251.

Hasson, K.W., D.V. Lightner, L.L. Mohny, R.M. Redman, B.T. Poulos & B.M. White. 1999. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of aquatic organisms*, 36(2), 81-93.

Hirono, I., S. Tinwongger, Y. Nochiri & H. Kondo. 2016. Latest research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps. In *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, 22-24 February 2016, Makati City, Philippines* (pp. 3-10). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

Knight, P.J., N. Crickmore & D.J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular microbiology*, 11(3), 429-436.

Lee, C. T., I. T. Chen, Y. T. Yang, T. P. Ko, Y. T. Huang, J. Y. Huang, M. F. Huang, S. L. Lin, C. Y. Chen, S. S. Lin, D. V. Lightner, H. C. Wang, A. H. J. Wang, H. C. Wang, L. I. Hor & C. F. Lo. 2015. The opportunistic marine pathogen

- Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798-10803.
- Lightner, D.V., R.M.Redman & T.A. Bell. 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 32(3-4), 209-233.
- Lin, S. J., K. C.Hsu & H. C. Wang. 2017. Structural Insights into the Cytotoxic Mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirAvp and PirBvp Toxins. *Marine drugs*, 15(12), 373.
- Lin, X., K.Parthasarathy,W.Surya, T.Zhang, Y.Mu & J.Torres. 2014. A conserved tetrameric interaction of cry toxin helix $\alpha 3$ suggests a functional role for toxin oligomerization. *Biochim Biophys Acta*, 1838(7), 1777-84.
- Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mohney, L.L., D.V.Lightner & T.A. Bell. 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 116-125.
- Pacheco, S., I.Gómez, S. S. Gill, A.Bravo & M.Soberón. 2009. Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides*, 30(3), 583-588.

- Poutou, R. A. 2009. Reseña de "Prácticas de biología molecular" de Concepción J. Puerta Bulla y Claudia P. Urueña. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 106-108.
- Pryor, R.J., & C. T. Wittwer. 2006. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Clinical Applications of PCR*, 19-32.
- Rodou, A., D. O. Ankrah & C. Stathopoulos. 2010. Toxins and secretion systems of *Photobacterium luminescens*. *Toxins*, 2(6), 1250-1264.
- Rosenberry, B. 1996. World shrimp farming. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 76.
- Sambrook, J.R., & D. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *Quarterly Review of Biology*, 76(3), 348-349.
- Sirikharin, R., S. Taengchaiyaphum, P. Sanguanrut, T. D. Chi, R. Mavichak, P. Proespraiwong, B. Nuangsaeng, S. Thitamadee, T. W. Flegel & K. Sritunyaluksana. 2015. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PloS one*, 10(5), e0126987.
- Tinwongger, S., Y. Nochiri, J. Thawonsuwan, R. Nozaki, H. Kondo, S. P. Awasthi, A. Hinenoya, S. Yamasaki & I. Hirono. 2016. Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1755-1765.
- Tran L., L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons & D. V. Lightner 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute

hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105:45-55.

Trujillo García, E.A. 2016. Neutralización de las toxinas PirA y PirB de *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 56 pp.

Zhou, Z., Z.Wang, Y.Liu, G.Liang, C.Shu, F.Song, X.Zhou, A.Bravo, M. Soberón & J.Zhang.2016. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. *Microbiology Open*, 5(4), 659-669.

Zuñiga-Navarrete F., I.Gómez, G.Peña, I.Amaro, E.Ortiz, B.Becerril, J.E.Ibarra, A.Bravo, M.Soberón.2015. Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin domain II loop 1 as the binding site of *Tenebrio molitor* cadherin repeat CR12. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59(2015), 50-57.

ANEXOS

Anexo 1. Alienamiento de las secuencias de PirA de las cepas VpAHPND con la secuencia reportada en el Genbank.

```
G9_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M8_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G10_ AP3F     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M22_ AP3F     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G2_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V9_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V5_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G7_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M9_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M37_ AP3F     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G8_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V8_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M8_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G3_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V2_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V16_ AP3F     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V4_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G6_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G1b_ AP3F     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V5_ AP3F      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G10_ AP3R     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V2_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M9_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G6_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G8_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G7_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G1b_ AP3R     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V16_ AP3R     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G2_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M22_ AP3R     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
M37_ AP3R     ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G3_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
Sec PirA    ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
G9_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V9_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V8_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
V4_ AP3R      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTCTGAACCAAAC
*****

G9_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
M8_ AP3R      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
G10_ AP3F     GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
M22_ AP3F     GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
G2_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
V9_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
V5_ AP3R      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
G7_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
M9_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
M37_ AP3F     GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
G8_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
V8_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
M8_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
G3_ AP3F      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCC GGAAGTCGGTCGTAGT
```


G6_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G8_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G7_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G1b_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
V16_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G2_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
M22_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
M37_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G3_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
Sec_PirA	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
G9_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
V9_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
V8_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
V4_AP3R	CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC

G9_AP3F	GCAAGTCGT
M8_AP3R	GCAAGTCGT
G10_AP3F	GCAAGTCGT
M22_AP3F	GCAAGTCGT
G2_AP3F	GCAAGTCGT
V9_AP3F	GCAAGTCGT
V5_AP3R	GCAAGTCGT
G7_AP3F	GCAAGTCGT
M9_AP3F	GCAAGTCGT
M37_AP3F	GCAAGTCGT
G8_AP3F	GCAAGTCGT
V8_AP3F	GCAAGTCGT
M8_AP3F	GCAAGTCGT
G3_AP3F	GCAAGTCGT
V2_AP3F	GCAAGTCGT
V16_AP3F	GCAAGTCGT
V4_AP3F	GCAAGTCGT
G6_AP3F	GCAAGTCGT
G1b_AP3F	GCAAGTCGT
V5_AP3F	GCAAGTCGT
G10_AP3R	GCAAGTCGT
V2_AP3R	GCAAGTCGT
M9_AP3R	GCAAGTCGT
G6_AP3R	GCAAGTCGT
G8_AP3R	GCAAGTCGT
G7_AP3R	GCAAGTCGT
G1b_AP3R	GCAAGTCGT
V16_AP3R	GCAAGTCGT
G2_AP3R	GCAAGTCGT
M22_AP3R	GCAAGTCGT
M37_AP3R	GCAAGTCGT
G3_AP3R	GCAAGTCGT
Sec_PirA	GCAAGTCGT
G9_AP3R	GCAAGTCGT
V9_AP3R	GCAAGTCGT
V8_AP3R	GCAAGTCGT
V4_AP3R	GCAAGTCGT

Anexo 2.

A) Alineamiento de clona 3 con la secuencia de PirA

```
PirA      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTGGAACCAAC
Clona_3_F -----GGTGAAATCAGCAT---ATTGACTGTCCACCAAC
                    ***** * **          *** ***** *****

PirA      GGAG-GCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGAAGTCGGTCGTAG
Clona_3_F  GGACGCGTCACAGAAGTAGACCGCAAACATACACCTATCCTTCGGAAGTCAGTCATAA
***  ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** **

PirA      TGTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGCTTACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCC
Clona_3_F  TTATACATTAAAATACGGGACGTCTGAGCTTACCCATCAAACATATGGTTGCGCC
* ** ***** * ***** ***** ***** ** * ** ***** *****

PirA      ATTTATGGCTGGCGGCTGGAAGTGGCTAAATCACATGTGGTACAACGTGATGAAACTT-
Clona_3_F  ATTACGGCTGGCGGAGGGAAAGTGGAACTCCCTGTGGACAAGGATAACTTT
*** * ***** ***** * * * ***** ***** * ** * ** **

PirA      ----ACCATTT-----ACAACGC-----CCTGATAATGC
Clona_3_F  GCCCATAGTTACCCAGACAATGCCATTTTCCTTCCACGTCAGATCCGCCTGATAATGC
          *   ***          **** **          *** *****

PirA      -----ATTCT-----
Clona_3_F  GTGCCCTTCCAGGATTTTTTCCAACCTTTCATTCCTGATTCTCCACCACTATACCCAGG
                    *****

PirA      -----ATCATCAGCGTATT---
Clona_3_F  GCTAGCAGGTCAATAATCAAACCCAGCCTAAGTCTCCGAAAGATCATAGCGTTCTA
                    ***** ***** **

PirA      -----GTTGT-----
Clona_3_F  CTCTCACAGATGTACTCACGTCGTCCCCCATCCAGCACCGATCACCCAGTACTACGTCCA
                    ** **

PirA      -----
Clona_3_F  GAGCAGACTCATATATTTCCCTGCTTGCCGCCTGAGAATCCCAACCCGCGGTCATACAC

PirA      -----AATTAACAATGG-----
Clona_3_F  CTCTAAATCTACAACATCAACTTCATAGTCAACTCGAAGCACTCCGCCAACATGTCTAC
          *** *****

PirA      -----CGCTAGTCGTG----
Clona_3_F  TATAAAATCGGAACAACATATACAGTCAAAAAATCTGAGCTGCCCGCTATTTTTGCTCA
                    ***** * **

PirA      ---GTTTCTGTACAA-----
Clona_3_F  ACTGTTTCAGTCTAATTCTAGACGAGCACTCTCACTCAGCGTTTCTTGACCACAAATAC
          ***** ** **

PirA      -----
Clona_3_F  GAGAGCAGTTTCTTGGATGCATATTTTAAGCTCACGACAACGAGCCTTTTAAGACTATTC

PirA      -----TCTATTACCAC----
Clona_3_F  GAGCATACTCTTCATGGTATATAGAGAGATTGTCCACCCCTCAAGTCTATATTATCTCA
                    ***** *
```

```

PirA -----
Clona_3_F CCGAGCAGCGTTCCAAGCCACTCCATTCAAGATAGACCCTTTAGATAACGGCTTTCCTCT

PirA -----
Clona_3_F CTTGAATTCGCGACAAGTTGAAGACTTTTTCGCACGTCCGATTTTTCAAATTATGTTTCTA

PirA -----
Clona_3_F AGGAAAAC TATAAAAACAGGAAGGGGATAAACATAGGAGGAGAACTTAGGATGAGATTTTA

PirA ----
Clona_3_F ACCA

PirA -----
Clona_3_R ATGAGTAACAATATAAAAC----ATGAAACTGACTATTCTCACGATTGG-----ACTGTC
--AAGCAGGCGGGTGGGATCGAGGTCAAAATCGCTATTGTCCCCTTCGCTGCCCGCGCC
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R GAACCAAACGGA-----GGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACA
TTGCCAAAATGATTTAAAAATTATTTGCACAACGGACGTC-CAAAGGTAATCAG-----A
  ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R TACACCTATCATC-CCGGAAGTCGGTCGT--AGTGTAGACAT-----TGAG
TTCACGCTTCATCGAAGGAAGGTGTTTCGCAAGGTAATGTGGGGGGGGGGGGTGAG
* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R AATA--CGGGACGT-----GGGGAGCTTACCATTG-----
GGTGTCCGGTACATATCCGAAAGTCTCGAGGGGGGGGGGCTCGATATTTCCCTGTCTGA
  * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R -----AATACCAA-----TGGGGTGCGCCATTTATGGCTGGCGGCTGGAAGTG-----
GGGACGAACACTAACAAATTGGGGTGTGCGGTGTACAACCCACAAATAAAGAGTGCATTCA
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R -----GCTAAATCACATG-----TGGTACAA---
ACACGCTGCAGAAGAGAGAGGGCAGTGTCTCCTAAGTCAGATGGACTACTTGTGCCAATA
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R -----CGTGATGAAA-----
GAACGCTCGCTCCAAGTAATAACGGATTCTTATGCGATCTCTCCGCGATTAAAGGGCGAC
  * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R CTT-----ACCAT-----TTACAAC-----
CTTTTGTCGATCATATGTGGCTGAGGTTTGTGTTCCACACATGTATTGCGACCCTTGCC
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R -----GCCCTG-----ATAATGC-----
TTTCAAGAATCGATATGTGGACCGTCGGAGAGCCCTGAACTTAATAATAAGAGCAAGATC
  ***** * * * * *

PirA -----
Clona_3_R -----ATTCTAT-----CA
GGTAAGAGGGCCTGACAGACATCTGGTTGACTTTCAAGCCGAAGACTCAATGGTAGAC
  * * * * * *

PirA -----
Clona_3_R TCAGCGTATTGTT-----
TCAGCATGGTATTACACACGGCCAGCTTCCAACAAGGAACATGGGGATAAAAAATAAT

```

```

***** * * **
PirA      ----GTAATTAACAATGG-----CGCTAG-----
Clona_3_R GTCCGTAAGCGACAATGGAAGAAAATTCCTCAGGGTGCCGGCCCTAACCGATAGGGCCG
          ****      * * * * *
          * * * * *

PirA      -----TCGTGGTTT-----
Clona_3_R CCATCAATGGGAGCCAGTGGATGACCAACCCGTGCCATTGGGGTTTGCAAAGTCCAACAG
          * * * * *

PirA      -----
Clona_3_R CAATCTGGCCTTGAGAACGAGATATAGAGCGACGAACATTTCTCCCCAGTAGCAACAACC

PirA      -----
Clona_3_R CCTCCAGCAAGTGGAACCGCATGTCGCGAGCCAACCGACACGAACCGTTCGGGATCCGCA

PirA      -----CTGTACAATCTA-----TTACCAC
Clona_3_R TTGGCTATAACTCAGGCGCACTATACATTCCATACTCTCATCCGCGTTTCCCC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B) Alineamiento de la clona 8 con la secuencia de PirA

```

PirA      ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTGCAACCAAAC
Clona_8_F --GGGGAAT-----TTCGTATGATTGGACTGTGCAACCAAAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCCAGGATCGGTTCGTAGT
Clona_8_F GGAGGCGTCACAGAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCCAGGATCGGTTCGTAGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      GTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGCTTACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCCA
Clona_8_F GTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGCTTACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      TTTATGGCTGGCGGCTGGAAAGTGCTAAATCACATGTGGTACAACGTGATGAAACTTAC
Clona_8_F TTTA GGCTGGCGGCTGGAAAGTGCTAAATCACATGTGGTACAACGTGATGAAACTTAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      CATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACAATGGC
Clona_8_F C TTTA AAC CC GATAATG TTTTA TCA GTATTG TGA TAC ATGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      GCTAGTCGTGGTTTCTGTACAATCTATTACCAC-----
Clona_8_F GC GTC GGT TGT CAATC GCA CACTGAGGATGGTCACTGTACCCCATTTGCT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA      -----
Clona_8_F AGGAGGGCCTTGTGTCACGGGAGTCGATGTCCACCACAGTCTCCTTCGCACTTCGAATTC

```


PirA
Clona_8_F -----
GATAAGTTGTTGGCTGCCATCTCTTTGGAGCCCGATGCCACGGGCAAGGCTCACTGCTGA

PirA
Clona_8_F -----
CCGATAAATGCCACATCGATCGACTTCGATCATGAGTGGCGAGAGCTGCCTGTGAAAGT

PirA
Clona_8_F -----
ACATAAACCTCATCATCATCATCATAAAACCATCCTCCAAGATGCTGAGAGAGAAAC

PirA
Clona_8_F -----
ACTTACAATATACGTTATTAATCTTGTAAGTAACAATTTCAACACTATTAAGAAAATC

PirA
Clona_8_F -----
TGATTCTAGAAGCAATCTCCCTCGCAGTTTGTACCGTGTACTAAGCTATTTCTTTC

PirA
Clona_8_F -----
TTCATTTAAAAGCTCACGGCACTCTTCATTTGTCGTGCTCGTCACAGCAGCCAGGTACAT

PirA
Clona_8_F -----
ATCAAACACGCTCGCCTCGAGACTTTTGAATTTGTGCCGGCCAGTATTCTCATCCACTAA

PirA
Clona_8_F -----
CTCACATTTAGCGTTTGTGAACAGGTCTCTGTTGTCTTGTGCATAGTACTACCATCGG

PirA
Clona_8_F -----
ACGTCCATTTTTGAATAAATATCTAGACATTTGGGCATGGTCGTGGGATGCGAAGAGGAA

PirA
Clona_8_F -----
TATTATGTATTTAGCGAGTGACCCATGCATCGAGACCACTGTTGAAGAGAGTCATCGTTG

PirA
Clona_8_F -----
ATACTGGCGAACTTCTCTGGACCCAAAATTTCACTTTCAACGTCCCAGGGGTCTCAACA

PirA
Clona_8_F -----
AGTTTTTTGTCCA

PirA
Clona_8_R ATGA-----GTAACAATATAAAACA-----
GGGACATACTTCACTTGGAAATATCAAAAACTTGTGACTCCTGATATATGCAATGCC
** * * * * * * * * *

PirA
Clona_8_R -----TGAAACTGACTATTCTCACGATTGGACTGTGCGA-----
AGATCGGTGAAACTGATCTCTCATAGCTGTGAACCTCTGCATCTATCTATTC

```

***** ** * * * * * * * *
PirA -----CCAAACGGA
Clona_8_R TCCGGTCTTGTACCCTGCTCGTCTGGCGGTTTCGTCTGCTACGTCTGCTTCCCAATGCT
** ** *

PirA -----
Clona_8_R TTTCTTAAGTACTACTATTTATATTTTACGCTTTCTCCTCCCTCGGCCTTTACTCAAAGTCTT

PirA -----ATGAG
Clona_8_R TTCCGAGAGTTATTTTAAACAAATTGTACATATTGATAGGTCGTCATACTGCCTGAAGA
* **

PirA TAACAA-----TATAAACATGAAACT-----GACTATT
Clona_8_R TAACAACCGTACTCTCTTTACCAAACGCTAAACTTTGAGCTACCTCGACGAAGACTACT
***** ** ***** *****

PirA -----CTCACGA-----TTGGACT
Clona_8_R AGCCCGGCACAAACTCAAAAAGTCTCGAAGGCAATGCGTGTCTGCTATGTACCTTGGTTT
**** *

PirA GTCG-----AACCAAACGGAGGCG-----TCACAGAAGTAGACAGCAAAC
Clona_8_R GCTGTGACGAGCATGATCAACTGAAAGAGTGCCTTGAGCTCCTAAATGAAGAAAG-AAAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA AT-----ACAC-----CTATCATCCCGAAGTCGGTC-----
Clona_8_R ATCTTTGTAACACGGTACAAAATTGTGACTGAGATTGCTCTTCAAGAATCAGATTTTCTT
** ***** ** * * * * * * * *

PirA -GTAGTGTAGACATTG-----
Clona_8_R AATAGTGTGAAAGTGTACTCTACAAGTTTAAATAATGTAATGTAAGTGTCTCTCTCT
***** ** * *

PirA -AGAATACGGGACG-----
Clona_8_R AAGCATATGGATGATGGTTTTATGATGATGATGATGATGAGGTCTATGTACTATCACAG
** *** *** *

PirA -----TGCGGAGCTTACCATTCAA-----TACCAATGGG-----GTG
Clona_8_R GTAGCTCAGAGCACTCACTGATTGAAGTCGATCTATATGTCCATTTATGGGTCGTGCAGTG
* * ** * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA CGCCATTTA---TGGC-----TGGCGGCTGAAAGTGGCTAAAT----
Clona_8_R AGCCTTGCACCGTGGCATCGGGTTCAGAGAGATGTCAGCCAGCAACCGTTCGATTTGGA
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA -----
Clona_8_R ACCGCGAAGGAGAATTTGGTAGACATCGACAGTATATGACACAAGACCTTGTGAACCATC

PirA -----CACATGTG-----GTACAACGTGATGAAACTTACCATTTAC
Clona_8_R GGGGTACACATGGGCATAATCAAAGCAGGCTCGTGGGATACAATGAAGGAAGACATTCAT
***** * ** * * * * * * * * * *

PirA AACG-----CCCTGATAATGCAT-----TCTATC-----A
Clona_8_R AAAGGTCGAGGATCATGATGATATAGTGCAAAAAATTTATCCGGAGGACAGTGAAGGGA
** * * * * * * * * * * * * * * * *

PirA TCAGC--GTATTG--TTGTAATTAACAATG-----
Clona_8_R CCAGCCAGTATGACTTGGGGTTTGCAATATCAACGACAGTTACGCGAGCATTGGGAAGCA
**** ** * * * * * * * *

PirA -----GCGCTAGTCGTG-----

```

```

Clona_8_R      GACGTAGAACGACGAACGCGCCAGACGAGCAGGGTACAAGACCGGACAATAGATAGATGC
                **** * * * *
PirA          -----GTTTC-----TG-----
Clona_8_R      AGAAGTTCAACAGCCATATGGACAAGATCAGTTTCACCGATCTCGCATTGCATATATCAG
                ***** **
PirA          ----TACAATCTAT-----TACCAC
Clona_8_R      GAGTCACAAGTTATTTGATAATCTTGCAAGTGAAGTATGTCCC
                **** * * * * * * *

```

C) Alineamiento de la clona 10 con la secuencia de PirA

```

PirA          ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAACTGACTATTCTC-ACGATTGGACTGTGCAACCAAA
Clona_10_F    -----GA----GGTCATTGTCACGATTGGACTGTGACCAAAA
                ** * **** ** *****
PirA          CGGAGGCGTACAGAAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGAAGTCGGTCGTAG
Clona_10_F    CGGAGGCGTACAGAAAGTAGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGAAGTCGGTCGTAG
                *****
PirA          TGTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGCTTACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCC
Clona_10_F    TGTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGCTTACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCC
                *****
PirA          ATTTATGGCTGGCGGCTGGAAAGTGGCTAAATCACATGTGGTACAACGTGATGAACTTA
Clona_10_F    ATTTATGGCTGGCGGCTGGAAAGTGGCTAAATCACATGTGGTACAACGTGATGAACTTA
                *****
PirA          CCATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAGCGTATTGTTGTAATTAACA-ATG
Clona_10_F    CCATTTACAACGCCCTGATAATGCATTCTATCATCAACGATTGTTGTAATTAACAATATG
                *****C*****
PirA          GCGCTAGTCGTGGTTTCTGTACAATCTATTACCAC-----
Clona_10_F    GCGCTAGTCGTGGTTTCTGTACAATCTATTACCCTTAATGATCCCAACCAATCTAATT
                *****
PirA          -----
Clona_10_F    CCCGCGCCGCCATGGTGTCCGGGAGCATGCAACTTCTCGCCTTTTTCTTCTATATTGA
PirA          -----
Clona_10_F    GTCTCATTACAATTCACTGGCAGGCGTTGTACACAGCCCTTGACCGGAAAACCCCGGCTC
PirA          -----
Clona_10_F    ATTACACAACCTCACTCGTGCAGATATACACCCCTTTTTCAACCCCTGTGTTTTAGCTA
PirA          -----
Clona_10_F    CATGTCCTTCACTAACCACATCCAAAATTTGATTCATCAAGAACGGCGTCTACTATA
PirA          -----
Clona_10_F    CTTCGTGCAGTATCTCTTTGAACATACATTGTTGAGCGTTGTAAAGTAGTTATTTCAATA
PirA          -----
Clona_10_F    CTTCCGTGTAGAATCTAATCTTTCCAATACAACCTCTCCCTTCTGATTTTTTATAGTGAG

```

PirA
Clona_10_F -----
TACAGTGGTGGTGTCTTTGTTTCTTTTATATTTTCATACATCAGTAGTTCATGTGTTAGAA

PirA
Clona_10_F -----
CTTTGTCCCTTCTAACTAATTAATTTATAACGACTAGCTGTGCTTTGAGTCTTTCTAAAT

PirA
Clona_10_F -----
TTATTACGAGAATTCATTTCTGGTAATACTATCTCTACTTTTACCTTTTGTTAATCAACG

PirA
Clona_10_F -----
TTCTTCAAAAAGAATCT

PirA
Clona_10_R -----
GCTTTTATCTTAAAAGCGGGGAGATGAGGAGAGTTAATTTGTACTAGAGGAGCGTCACAG

PirA
Clona_10_R -----
GATTGTTAACTGCACTCATCGCGAGTACTATTACTGATTCTAGCAACAACAAAGCTGTGA
* ** * * * * *

PirA
Clona_10_R -----
TAAAACAT-----GAAACT-----
TGAAAAATGACGAGTTTGTATAGATGGCCCGAAACTAGTATAATGTGATTCGTATATAGG
* *** ** * * * * *

PirA
Clona_10_R -----
AAATCGATCCTGTATTAATCGGGGAGATATTTATTCTGCGGGTGCCTTCGTTGAGCATT

PirA
Clona_10_R -----
ATTAGTATTTTTTATTTAAAAATAGGCGCTTATTTCGACGCTCTTTCGGCTTATTTCT
* * * * *

PirA
Clona_10_R -----
TCTAAATAACTTGAAGAAGTGTGTGAAAACCGCTTTGAGCGGTTTTTTAGTTTTTCTAT

PirA
Clona_10_R -----
GTCGTTTTAAAGGAAGTTTTTGAATGGTCAACGTCTCTGCTGAAATGCTGCATAGTAAA

PirA
Clona_10_R -----
TTATGCTGGGTCCATTGGCACAAGGAAGGAGTTCTTGCGCACATTTGATACGTCCCGTG

PirA
Clona_10_R -----
GCATTTCTTCGGACAAAGAAATGTAATTGGGTTTTGGTAGATTAACCTGGGGTTCTGAAG

PirA
Clona_10_R -----
TGGGCCCTTGCTCTGATAAGAGGGGCTTATGATTAAGCCAGGGAACGGGAGGCAAAAA
* * * * *

PirA
Clona_10_R -----
CTATAGATGGGATCGTTTTAAAAACGAATGGGAAGAGTTACGGAAGGAGAGTTCAAATATG
*** ** *

PirA
CACCTATCATCCCGAAGTCGGTCGTAGTGTAGACATTGAGAATACGGGACGTGGGGAGC

```

Clona_10_R      AACTTATGGGGCAGGATGTGGGTGGGTGTGTAAACGATGGGAATTCAGGTCGTGGGGAGG
                  ** ***      * *** ** ** *  ** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** **
PirA            T-TACCATTCAATACCAATGGGGTGCGCCATTTATGGCTGGCGGCTGGAAAGTGGCTAAA
Clona_10_R      GAAACCAGTGAATACGAAGGGGTTCCTCTTTGGGGGGGAGGATTGAAAGTGGTTAAA
                  **** *  ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** ** **
PirA            TCACATGTGGTACAA-CGTGATGAAA-CTTAC-CATTTACA-ACGCCCTGATAATGCATT
Clona_10_R      TCACATGTGGTATAAGCGTGATGAAAGGTTACACATTTGCAGACGCCCTGATAGAGCATT
                  **** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
PirA            CTATCATCAGCGTA-TTGTGTGAATT---AACAAATGGCGCTAGTCGTGGTTTCTGTACAA
Clona_10_R      ATATCTACAGCGTATTTGATGTAAATTGAAGCAGT-GCGTCAGTACGCGTTCC-----
                  ****  ** ** ** ** ** *  * ** * ** ** ** ** ** ** ** ** *
PirA            TCTATTACCAC
Clona_10_R      -----

```

- Inserciones
- Deleciones
- Mutaciones

