

Identificación, aislamiento y caracterización molecular del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa a partir de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*)

J.M. Figueroa-Hurtado¹, I. Loera-Mendoza², y M.F. León-Galván².

1 Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. jm.figueroahurtado@ugto.mx

RESUMEN: En la reducción del oxígeno se desprende una gran cantidad de energía generando reacciones químicas productoras de especies reactivas del mismo, las cuales desencadenan enfermedades coronarias, neurodegenerativas, entre otras, este proceso es controlado con la protección de antioxidantes, manteniendo un equilibrio constante. Los antioxidantes son ingeridos en la dieta y estudios demuestran la presencia de estos compuestos en *Brassica oleracea* var. *Itálica*. Para esto se identificó, se aisló y se realizó un análisis bioinformático al gen Superóxido dismutasa a partir de brócoli, indicando un marco de lectura abierto de 88 nucleótidos.

Palabras clave: Antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, superóxido dismutasa.

ABSTRACT: In the reduction of oxygen a large amount of energy is released generating chemical reactions producing reactive species thereof, which trigger coronary, neurodegenerative diseases, among others, this process is controlled with the protection of antioxidants, maintaining a constant balance. Antioxidants are ingested in the diet and studies show the presence of these compounds in *Brassica oleracea* var. *Italic* for this, a bioinformatic analysis of the superoxide dismutase gene from broccoli was identified, isolated and performed, indicating an open reading frame of 88 nucleotides.

Keywords: Antioxidants, reactive oxygen species, superoxide dismutase.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha generado un gran interés por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres (RL), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes, debido a su importante participación bioquímica y biológica en los organismos vivos (Venereo, 2002). El oxígeno es participe en el metabolismo de los organismos aerobios, este forma parte en diversas reacciones de oxidación, de entre las cuales se generan las especies reactivas de oxígeno debido a la reducción de este, obteniéndose en su mayoría radicales libres, los cuales si sobrepasan las defensas antioxidantes se forma un desequilibrio en el organismo generando un estrés oxidativo que se desencadena en enfermedades neurodegenerativas (González, 2000).

Un radical libre (RL) es una especie reactiva de oxígeno (ROS) que presenta un electrón desapareado en su último orbital lo cual le genera una alta inestabilidad (Mayor-Oxilia, 2010), es por esto que tiende a asociarse con moléculas orgánicas de interés, provocando un daño a nivel celular y tisular, que desencadena en diversos padecimientos como carcinogénesis, envejecimiento y desordenes de tipo neurológico (González, 2000).

El radical superóxido es una de las especies reactivas más dañinas, su alta toxicidad es debida a su corta vida (10⁻⁹ segundos) y una alta reactividad que le permite interactuar con todo tipo de sustratos (Montero, 1999). Para hacer frente a la toxicidad de las ROS, las plantas han desarrollado eficientes mecanismos antioxidantes, al suprimir parcialmente la producción de ROS o a su eliminación (Faize *et al.*, 2013).

Existen mecanismos de defensa antioxidantes en nuestro propio organismo y en la dieta que ingerimos (Montero, 1999). Los sistemas antioxidantes pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (Clapés, 2000). Los enzimáticos protegen frente a las ROS durante el metabolismo, destacando la superóxido

dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). Mientras que los no enzimáticos están presentes en la dieta como son verduras y frutas, estas neutralizan un único radical libre por molécula y solo actúan en concentraciones elevadas (Montero, 1999).

La SOD es la primera línea de defensa antioxidante catalizando la dismutación del anión superóxido, antes de que origine otros agentes tóxicos (García *et al.*, 2000). Por su parte los alimentos de origen vegetal han demostrado un efecto protector ante algunas enfermedades cerebro y cardiovasculares gracias a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante (Padilla, 2008), de la cual destaca la especie *Brassica oleracea* var. Itálica (Armento, 2004). En 2017 Guanajuato se consolidó como el primer exportador de brócoli en el país; obteniendo más del 60% del producto total exportado a Estados Unidos (SIAP, 2018).

Sin embargo, no se ha profundizado en el estudio de la actividad antioxidante enzimática en brócoli, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar, aislar y caracterizar molecularmente el gen antioxidante que codifica para la enzima SOD de Brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó florete fresco de brócoli (*Brassica oleracea*) de la variedad Itálica, proporcionadas por Mar-Bran planta III, Jaral de Progreso, Guanajuato.

Extracción de RNA de Brócoli por el Método de Trizol™ Reagent

Para la extracción de RNA, todo el material de laboratorio se trató previamente con etanol-DEPC por un mínimo de 3 horas y posteriormente se esterilizó a 121°C 15 min a 15 lb, una vez esterilizados se mantuvieron a -20°C hasta su uso. La extracción de RNA se realizó empleando el método de Trizol. El RNA obtenido se analizó en gel de agarosa desnaturizante al 1% teñido con bromuro de etidio y se visualizó por luz UV en el fotodocumentador GelDoc System de Bio-Rad.

Síntesis de la Doble Cadena de DNA

La síntesis de cDNA se realizó de acuerdo con lo descrito en el protocolo SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual de Clontech (apéndice A). Para la amplificación se utilizó el termociclador DUAL de Bio-Rad con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos, seguido de 34 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 65°C por 45 segundos y una de polimerización de 72°C por 6 minutos, finalmente se dio un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Detección y amplificación de un fragmento de SOD de cDNA Brócoli mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la estandarización de las condiciones de amplificación de una región del gen SOD, se preparó una mezcla con los siguientes reactivos: 5µL de polimerasa JumpStart®, 1.5µL de cada oligonucleótido (“directo” y “reverso”) 1.0µL de MgCl₂ (25mM) y 1.0µL de cDNA, teniendo un volumen final de reacción de 10 µL. La amplificación se realizó en el termociclador DUAL Bio-Rad, con un ciclo de temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5:00min seguido de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1:00 min, temperatura de alineamiento (T_m) de 58°C por 45 segundos, temperatura de polimerización de 72°C por 1:00min y un ciclo de polimerización final de 72°C por 7:00min. El producto de PCR amplificado, se analizó en gel de agarosa desnaturizante al 1% y se visualizó por la luz UV en el fotodocumentador GelDoc System de Bio-Rad. El producto de PCR obtenido se secuenció en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) de San Luis Potosí

Análisis Bioinformático del Fragmento Gen SOD

Se obtuvieron las secuencias directa y reversa del fragmento del gen SOD, mismas que se ensamblaron a partir del software BioEdit. La caracterización del fragmento del gen SOD, se realizó en primer plano con el análisis bioinformático de las secuencias en la plataforma bioinformática de NCBI

Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE) del gen SOD

Para la obtención de los extremos 5' y 3' del gen SOD, se empleó la técnica de RACE (Amplificación Rápida de Extremos de cDNA). En la primera reacción se utilizó el oligonucleótido SMART II A y SOD "reverso", este par de oligonucleótidos permitió obtener el extremo 5' del gen SOD (5' RACE-PCR) realizándose un PCR con un ciclo de temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5:00min seguido de 25 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 0:25 min, temperatura de alineamiento de 58°C por 45 segundos, temperatura de polimerización de 72°C por 1:00min y un ciclo de polimerización final de 72°C por 7:00min. El 3' RACE-PCR se obtuvo utilizando el par de oligonucleótidos SOD "directo" y CDS, realizando un PCR con un ciclo de temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5:00min seguido de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1:00 min, temperatura de alineamiento de 58°C por 45 segundos, temperatura de polimerización de 72°C por 1:00min y un ciclo de polimerización final de 72°C por 7:00min. Los fragmentos obtenidos mediante PCR fueron secuenciados en LANBAMA, San Luis Potosí.

Análisis del Marco de Lectura Abierto (ORF) del Gen SOD

Se realizó el aislamiento y ensamblaje del gen SOD, a partir de un análisis bioinformático de las secuencias correspondientes a los productos de PCR de los extremos 5' y 3' obtenidos en el RACE. Las secuencias se ensamblaron con BioEdit para obtener el marco de lectura abierto (ORF).

Caracterización Bioinformática del Gen SOD

Posteriormente la secuencia obtenida mediante el RACE se analizó en la plataforma bioinformática de NCBI para la obtención y caracterización de la secuencia completa codificante para el gen SOD de Brócoli.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de RNA obtenido por el método de TRIzol™ fue analizado por electroforesis (Figura 1). La presencia de un barrido en el carril 4, corresponde a los RNA mensajeros, también se pueden distinguir dos bandas bien definidas que corresponden a los ribosomales, 5S y 18S indicando que el método de TRIzol™ permitió obtener un RNA libre de DNA y de una excelente calidad. Por su parte en el carril 2 se puede observar un RNA degradado esto puede ser debido a la presencia de RNAsa al momento de realizar la extracción.

El cDNA sintetizado permitió obtener la región que flanquean los oligonucleótidos Directo y Reverso utilizados para la amplificación. En la figura 5 se muestra el fragmento amplificado del gen de SOD alrededor de las 300 pares de bases obtenido a partir de cDNA. El fragmento amplificado es menor al obtenido con DNA sugiriendo la presencia de intrones en el amplicón obtenido con este último.

La secuenciación del producto de PCR permitió

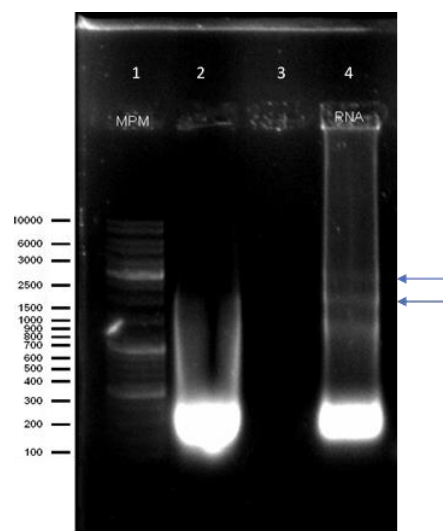
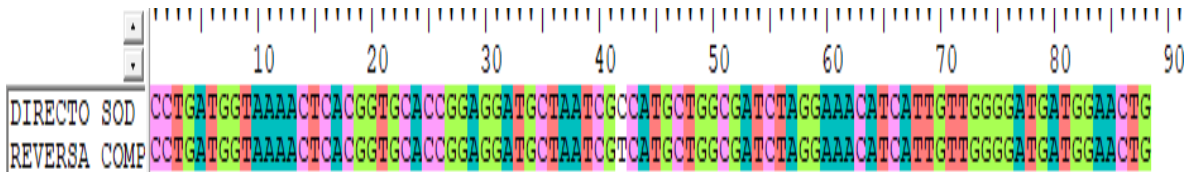


Figura 1 RNA de Brócoli. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb plus, carril 2 muestra de RNA degradada, Carril 4: Muestra de RNA Total de Brócoli

identificar una secuencia de un total de 88 nucleótidos (Figura 2), con una identidad de 100% con *Brassica oleracea* var. *Botrytis* (Figura 3). Al realizar un alineamiento múltiple de secuencias en BioEdit, comparando el oligonucleótido directo y la reversa complementaria se obtuvo una similitud de casi el 100% difiriendo en una citosina.

Figura 2 Alineamiento de las secuencias Directo SOD y Reversa complementaria SOD



Una vez detectado el gen SOD se realizó una amplificación rápida de extremos de cDNA con los oligonucleótidos de SMART II A y Reverso SOD para el extremo 5', mientras que para el extremo 3' se utilizaron los oligonucleótidos CDS y Directo SOD obteniéndose el marco de lectura abierto (ORF) del gen SOD. Para el extremo 5' (figura 4) se obtuvo una amplificación de aproximadamente 600 pares de bases, mientras que para el extremo 3' (figura 5) se logró una amplificación alrededor de las 400 pares de bases.

Figura 3 Principales secuencias que contienen un alineamiento significativo comparado con el fragmento de gen SOD a partir de *Brassica oleracea* var. *Itálica*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> superoxide dismutase Cu-Zn2 mRNA, complete cds	163	163	100%	6e-37	100%	MG598641.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> superoxide dismutase [Cu-Zn] (LOC106377019), mRNA	158	158	100%	3e-35	99%	XM_013817167.2

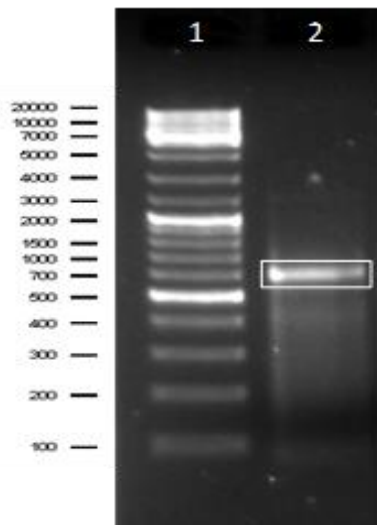


Figura 4 Amplificación del extremo 5'SOD. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb plus, Carril 2: amplificación del extremo 5'SOD

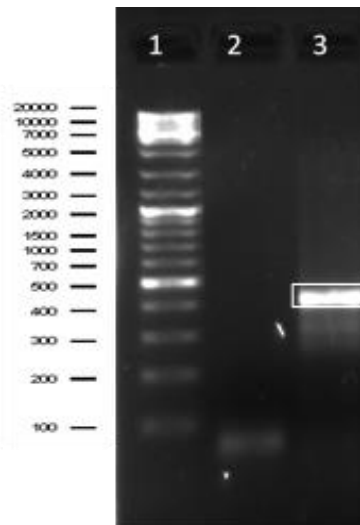
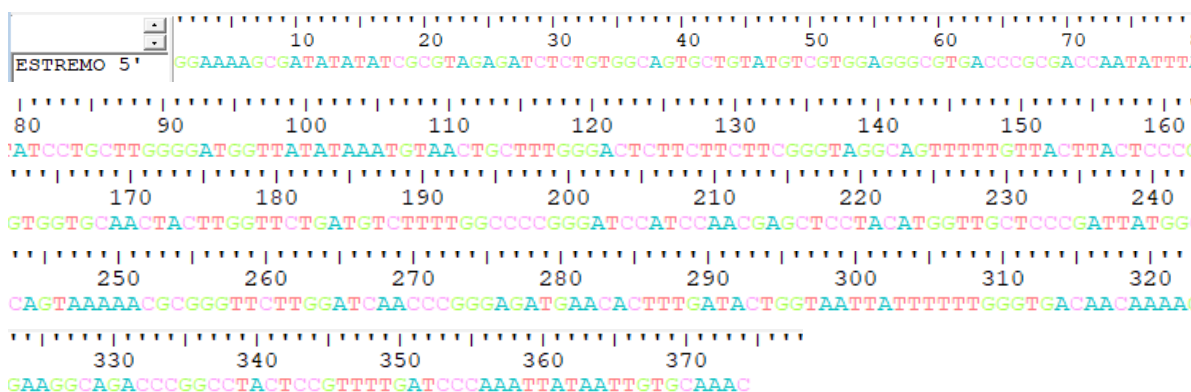


Figura 5 Amplificación del extremo 3'SOD. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb plus, Carril 3: amplificación del extremo 3'SOD

Los productos de PCR fueron secuenciados y posteriormente alineados con ayuda del programa BioEdit. Obteniéndose para el extremo 5' un total de 374 nucleótidos (Figura 6). Mientras que el producto de PCR del extremo 3' se debe mejorar para obtener una secuenciación que permita obtener el ORF del gen *SOD* para su caracterización bioinformática.

Figura 6 Extremo completo de 5'



BIBLIOGRAFÍA

- Armento, J. C. (2004). Capacidad antioxidante y contenido en fenoles totales de la berza gallega (*Brassica oleracea*). *Área de tecnología de los alimentos, Facultad de ciencias. Universidad de Vigo. Campus As Lagoas*, 1-6.
- Clapés, S. (2000). Diabetes Mellitus, estrés oxidativo y embarazo . *Cubana Invest Biomed*, 19(3):191-5.
- Faize et al., M. L.-E. (2013). Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase achance in vitro shoot multiplication in transgenic plum. *Journal of Plant Physiology* , 625-632.
- García et al., B. O. (2000). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasa. *Rev Cubana Invest Biomed*, 14(1).
- González, M. B. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Universidad Autonoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, México DF, Revista BIOQUIMICA* , 25 (1):1-98.
- Mayor-Oxilia, R. (2010). Oxidative Stress and Antioxidant defense system . *Instituto de Medicina Tropical, Asunción. Paraguay*, 5(2):23-29.
- Montero, M. (1999). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela. España*, 57(4):1025-5583.
- Padilla, F. A.-R. (2008). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas* (Vol. 58). Caracas, Venezuela: Sociedad Latinoamericana de Nutrición.
- SIAP, S. d. (1 de diciembre de 2018). *gob.mx*. Obtenido de México produjo 567 mil toneladas de brócoli en 2017: <https://www.gob.mx/siap/articulos/mexico-produjo-567-mil-toneladas-de-brocoli-en-2017?idiom=es>
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto"*, *Rev Cubana Med Milit*, 31(2): 126-33.