



PRODUCCIÓN EN LOTE DE pVAX1-NH36 HOSPEDADO EN *Escherichia coli* DH5 α

E. Ivonne Niño P., Yazmín Pérez M., Rosa Ma. Montesinos C., Jaime Ortega L., Armando Tejada M.
Universidad de Sonora. Rosales y Boulevard Luis Encinas. Hermosillo, Sonora cp. 83000

E-mail: rmontesinos@gauss.mat.uson.mx

Palabras clave: Producción, pDNA, cinética de crecimiento.

Introducción. El éxito de la terapia génica y las vacunas de DNA utilizando DNA plasmídico (pDNA) como vector, depende del desarrollo apropiado de procesos de producción de pDNA a gran escala. En estos procesos, la producción y rendimiento de plásmido está determinadas por la fermentación y las operaciones cromatográficas de purificación [1].

El objetivo de este trabajo fue investigar la producción de pVax1-NH36 (4000 pb), para su uso en vacunas contra la leishmaniasis, en un cultivo por lotes y su purificación mediante operaciones cromatográficas HIC-SEC.

Metodología. Se utilizó el plásmido pVax1-NH36 hospedado en *E.coli* DH5 α . El cultivo se realizó en 150 mL de medio Terrific Broth. Se inoculó para obtener un índice de masa inicial de 25 y se agregó kanamicina para alcanzar 50 $\mu\text{g/mL}$. La recuperación primaria e intermedia del plásmido se realizó por medio de lisis alcalina, precipitación con isopropanol, resuspensión y precipitación con sulfato de amonio, de acuerdo a lo reportado [2]. La solución de pDNA se purificó en una columna HIC empacada Phenyl Sepharose 6 fast flow (Sigma) y se desaló por SEC. Se tomaron muestras a lo largo de todo el proceso para su análisis electroforético.

Resultados y discusión. La Figura 1 muestra la curva de crecimiento del sistema y el modelo de crecimiento ajustado con una $\mu = 0.4 \text{ h}^{-1}$ y una $X_{\text{max}} = 3 \text{ mg/mL}$ en peso seco. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado en la literatura [3].

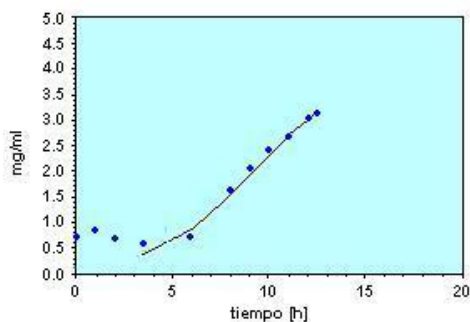


Fig. 1. Curva de crecimiento de *E. coli* transformada con pVax1-NH36 expresada en peso seco de células: (•), puntos experimentales; línea continua, modelo.

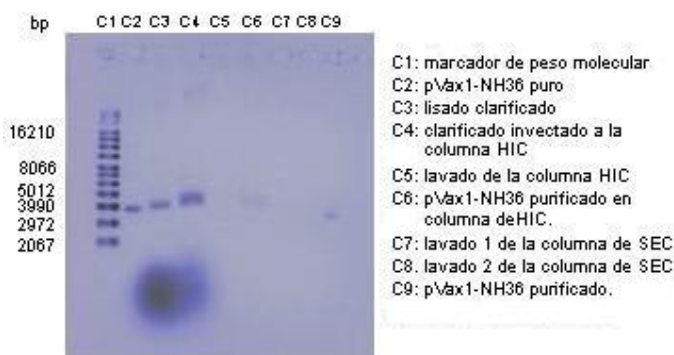


Fig. 2. Análisis electroforético de la purificación de pVax1-NH36.

En la Figura 2 se presenta los resultados del análisis por electroforesis. Puede observarse que el plásmido se ubica a la altura del marcador de 3990 pb. El lisado presenta una gran cantidad de RNA. Una vez purificada la muestra se observa sólo el plásmido.

Conclusiones. La células de *E. coli*-pVax1-NH36 crecen apropiadamente en el medio Terrific Broth. La velocidad específica de crecimiento y peso seco obtenidos fue similar a los reportados en la literatura. Mediante cromatografía HIC y SEC se logró purificar el plásmido pVax1-NH36. Se requieren realizar estudios a nivel piloto para determinar la productividad real del sistema.

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo recibido del PROMEP y la Universidad de Sonora.

Bibliografía.

1. Carsten V. (2008), Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and genetic vaccination. *Chem. Eng. Technol.* 31: 858-863.
2. Freitas, S.S; Santos, J.L.; Prazeres, D. M. (2008). Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep. Purif. Technol.* 65:95-104.
3. Nikerel, I.E.; Toksoy, E.; Kirdar, B.; Yildirim, R. (2006). Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 32: 1-6.

