



## ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE APA DE *Mycobacterium tuberculosis* EN CULTIVOS SUMERGIDOS DE *Escherichia coli* A BAJAS TEMPERATURAS

Diego Rosiles-Becerril, Norma A. Valdez-Cruz, Mauricio A. Trujillo-Roldán,

Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

04510, México, D.F. maurotru@biomedicas.unam.mx

*Palabras clave:* antígeno, glicoproteína recombinante, APA (45/47)

**Introducción.** La glicoproteína APA la cual es un antígeno inmunodominante (1), es de interés para el desarrollo de una nueva vacuna, y para la realización de un kit diagnóstico (2). Un problema que se tiene al producir proteínas recombinantes en *E.coli* es, que frecuentemente se acumulan intracelularmente formando cuerpos de inclusión. Éstos son agregados insolubles de proteína incorrectamente plegada que comúnmente están formados en su mayoría por la proteína recombinante, y aunque ya existen métodos de separación y purificación de cuerpos de inclusión, se ha observado que no siempre resultan tener actividad biológica cuando se desnaturalizan y se repliegan (3).

El objetivo de este proyecto es evaluar la producción de la proteína recombinante APA de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivos de *E. coli* sumergidos en condiciones de temperatura subóptimas (tan bajas como 12°C), analizando la cantidad de proteína que se agrega en CI como aquella que se produce en forma soluble.

**Metodología.** Se realizaron cinéticas de la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta pET15B-APA, en matraz de 500 mL con 25% de volumen de llenado a 150 rpm y en biorreactor de 1.0 L (Applikon, USA) a un oxígeno disuelto >20%, a 37, 23 y 12°C utilizando el medio de cultivo LB, pH inicial de 7.5 con 0.25 g/L de ampicilina y 0.034 g/L de cloranfenicol. LKos cultivos se uso IPTG (0.1mM) como inductor cuando se alcanzaba 1 U.A. a 600 nm. El análisis de la proteína se realizó a partir de electroforesis SDS-PAGE 12.5%.

### Resultados.

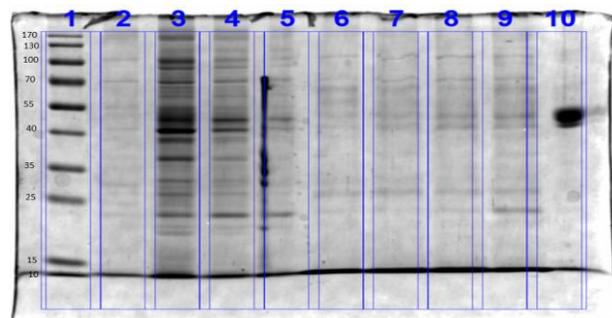


Fig 1. Gel de cinética en matraz a 37°C. Carril 1-Marcador de peso molecular, 2-hora 3 sin inducir (fracción soluble), 3-hora 6 inducida (fracción soluble), 4-hora 8 inducida (fracción soluble), 5-hora 10 inducida (fracción soluble), 6-hora 3 sin inducir (fracción insoluble), 7-hora 6 inducida (fracción insoluble), 8-hora 8 inducida (fracción insoluble), 9-hora 10 inducida (fracción insoluble), 10- APA purificada.

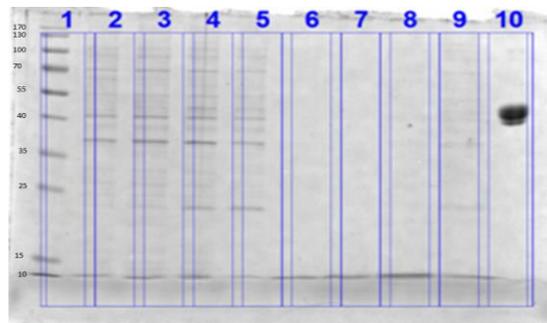


Fig 2. Gel de cinética en matraz a 23°C. Carril 1-Marcador de peso molecular, 2-hora 7 sin inducir (fracción soluble), 3-hora 9 inducida (fracción soluble), 4-hora 11 inducida (fracción soluble), 5-hora 14 inducida (fracción soluble), 6-hora 7 sin inducir (fracción insoluble), 7-hora 9 inducida (fracción insoluble), 8-hora 11 inducida (fracción insoluble), 9-hora 14 inducida (fracción insoluble), 10- APA purificada.

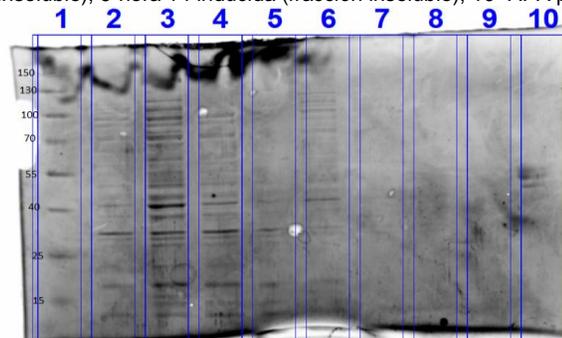


Fig 3. Gel de cinética en matraz a 12°C. Carril 1-Marcador de peso molecular, 2-hora 96 sin inducir (fracción soluble), 3-hora 120 inducida (fracción soluble), 4-hora 144 inducida (fracción soluble), 5-hora 168 inducida (fracción soluble), 6-hora 96 sin inducir (fracción insoluble), 7-hora 120 inducida (fracción insoluble), 8-hora 144 inducida (fracción insoluble), 9-hora 168 inducida (fracción insoluble), 10- APA purificada.

**Conclusiones.** Se observó que al sumergir los cultivos de *Escherichia coli* productora de la proteína de *Mycobacterium tuberculosis* APA en condiciones subóptimas, la formación de cuerpos de inclusión se ve disminuida a 23°C, en comparación a 37°C, y 12°C éstos ya no se observan.

**Agradecimiento.** CONACYT 178528, 214404 y 220795; PAPIIT-UNAM IN-210013 y IN-209113.

### Bibliografía.

- (1) Dobos K., Khoo K., Swiderek K., Brennan P., Belisle J. (1996), *J. Bacteriol.* 178(9)2498-2506.
- (2) Gamboa-Suasnavart R., Valdez-Cruz N., Cordova-Davalos L., Martínez-Sotelo J., Servín-González L., Espitia C., Trujillo-Roldán M. (2011), *Microb Cell Fact.* 10:110
- (3) Buchner J, Pastan I, Brinkmann U (1992), *Anal Biochem* 205, 263-270