



EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO RECOMBINANTE GLICOSILADO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Daniel Juarez Lopez, Mauricio Alberto Trujillo Roldán, Clarita Olvera, Norma Adriana Valdez Cruz.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM. México, Distrito Federal. Email: adriavdez1@gmail.com

Palabras clave: antígeno, tuberculosis, vacuna.

Introducción. Se han descrito una amplia variedad de antígenos producidos por el bacilo *M. tuberculosis* que poseen la capacidad de elicitar la proliferación de linfocitos T y levantar una reacción de tipo hipersensibilidad retardada. Entre ellos se encuentra un antígeno glicosilado de ~30 kDa que demuestra una alta actividad antigénica e inmunogénica cuando es comparado con otros antígenos del mismo en ensayos *in vivo* e *in vitro*. La utilización de antígenos de este tipo para la formulación de vacunas multiméricas o para la detección rápida de la enfermedad ha sido probada eficazmente y propuesta como una nueva tecnología en la prevención de la tuberculosis¹. Sin embargo, la expresión y purificación de este antígeno glicosilado se ha visto retardada por problemas de bajo rendimiento de producción en ciertos hospederos utilizados previamente tal como *E. coli* y *S. lividans*. De ahí se propuso el diseño de un nuevo bioproceso para producir y recuperar de manera más eficiente el antígeno glicosilado de ~30 kDa con características similares al que produce *M. tuberculosis*. Lo anterior nos permitirá caracterizar el antígeno modificado y realizar ensayos inmunológicos para determinar su antigenicidad.

Metodología. La secuencia codificante para el antígeno se insertó en un vector inducible por metanol pPICZBα. La transformación se realizó en el hospedero *P. pastoris* y se obtuvieron colonias positivas en medio selectivo YPDS con Zeocina. El cultivo e inducción se realizó en matraz agitado. Inicialmente se obtuvo una buena cantidad de biomasa en medio BMGY y posteriormente las células se cambiaron a medio BMMY con 1% de metanol para inducir la producción de proteína recombinante. A partir de la proteína extracelular, se identificó y cuantificó el antígeno recombinante en geles PAGE-SDS e inmunodetección por Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal. Las modificaciones postraduccionales fueron identificadas usando la lectina Concanavalin A acoplada a peroxidasa (ConA-HRP). La purificación del precipitado también se realizó en HPLC en columna C18 analítica.

Resultados.

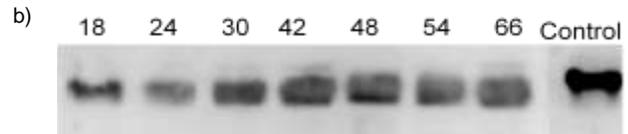
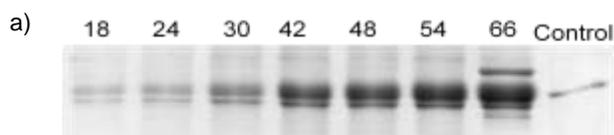


Figura 1. a) Producción de proteína recombinante secretada en el medio de cultivo BMMY de *P. pastoris* transformada. Los números sobre los carriles indican la hora de cultivo en la que se tomó muestra y la flecha indica la proteína recombinante secretada. b) Identificación del antígeno por inmunoensayo con un Mab específico para la proteína heteróloga. Control: antígeno no glicosilado producido en *E. coli*.

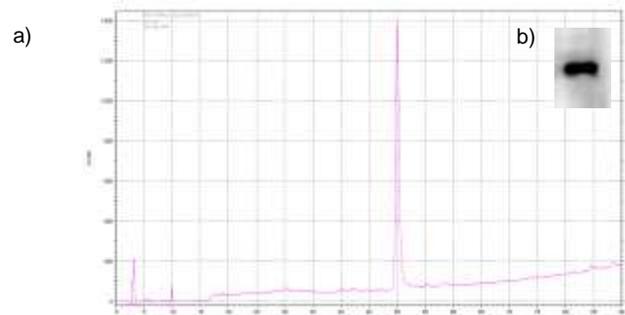


Figura 2. a) Cromatograma de proteína total de sobrenadante separado en una columna C18 analítica mediante rpHPLC. El componente mayoritario es el antígeno recombinante. b) Inmunoensayo con lectina ConA-HRP del componente mayoritario obtenido por rpHPLC correspondiente al antígeno glicosilado.

Conclusiones. El antígeno glicosilado de ~30 kDa fue producido y expresado en el hospedero *P. pastoris* con una productividad volumétrica de 72 mg/L en el medio de cultivo BMMY en matraz convencional agitado. La purificación en HPLC de fase reversa dio como resultado una fracción correspondiente al antígeno y la detección con ConA-HRP demostró estar glicosilado.

Agradecimientos. CONACyT 220795, 178528, 181895 y PAPIIT-UNAM (IN209113, IN210013, IN208415). Daniel Juarez agradece la beca de maestría otorgada por CONACyT 388590/288329 y DGAPA-UNAM.

Bibliografía.

1. Sable S., Cheruvu M., Nandakumar S., Sharma S., Bandyopadhyay K., Kellar K., Posey E., Plikaytis B., Amara R., Shinnick T. (2011). *PLoS ONE* 6(7):e22718