



PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR CROMATOGRAFÍA EN MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO: UN PROCESO FACTIBLE DE ESCALAR

Víctor Rodríguez Vargas², Rosa Ma. Montesinos Cisneros², Armando Tejeda Mansir¹ y Jaime Ortega López²
¹DICTUS. Universidad de Sonora Apdo. Postal 593 Hermosillo Son. ²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2508. México, DF. CP 07360.
Fax: 50613313. jortega@cinvestav.mx

Palabras clave: plásmido, cromatografía, membranas de intercambio iónico.

Introducción. La demanda de ADN plasmídico y la necesidad de tenerlo en condiciones de alta pureza para la aplicación en terapia génica y vacunas de ADN (1), hacen necesaria la implementación de procesos que sean escalables para la producción, extracción y purificación de grandes cantidades plásmidos y con el grado de pureza requerido por las investigaciones a nivel clínico. En la etapa de purificación la cromatografía en membranas de intercambio iónico es una de las alternativas con mayor potencial (2). En el presente trabajo se purificó el ADN plasmídico, por cromatografía en membranas de intercambio iónico, como un paso inicial para la producción, extracción y purificación de plásmidos por un proceso factible de escalar.

Metodología. En todos los experimentos se utilizó *Escherichia coli* DH5 α conteniendo el plásmido pcDNAEhpc112 de 6.7 kb (3). La bacteria se creció a 37 C por 20 h en un reactor de 2l, suplementado con extracto de levadura 10 g/l, peptona de caseína 16 g/l y NaCl 5 g/l. La suspensión celular obtenida se lisó, adicionando NaOH hasta una concentración 0.09 M y SDS al 1 %. Después de 5 minutos se neutralizó con acetato de potasio 3M. El lisado celular se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. y el DNA plasmídico en el sobrenadante se precipitó con isopropanol. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y finalmente se resuspendió en agua. La purificación se llevó a cabo por cromatografía de intercambio aniónico en una membrana Mustang Q, eluyendo el ADN con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl en Tris-HCl 50mM, pH 8 y las fracciones se analizaron en geles de Agarosa al 0.7 %.

Resultados y discusión. En la figura 1 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación del ADN plasmídico en membranas Mustang Q de intercambio aniónico. La elución del DNA ocurrió a una fuerza iónica de 60.49 mS/cm. El análisis electroforético de la muestra inicial (fig. 1, carril 2) y de la fracción correspondiente al pico de elución (fig. 1, carril 3) muestra además de las bandas correspondientes al ADN plasmídico, restos de RNA. Después de digerir y eliminar el ARN, se obtuvieron 21 mg de ADN plasmídico por litro de cultivo (1.4 mg de ADN /g de células base húmeda) lo que representa alrededor del 90 % de plásmido total. Los resultados obtenidos son similares o mejores a los reportados en la literatura (2) y sugieren que la captura del ADN plasmídico mediante membranas de intercambio iónico es un proceso adecuado para la producción y purificación de

plásmidos. Sin embargo, para poder escalar este proceso se requiere modificar las etapas de extracción y captura para eliminar el ARN, determinar la calidad del plásmido (grado de superenrollamiento) y adicionar una etapa de refinamiento para obtener el grado de pureza requerido.

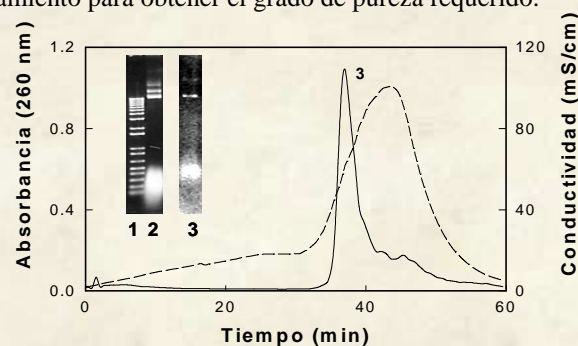


Fig 1 Cromatografía de ADN plasmídico a membranas de intercambio aniónico. La línea continua representa la Absorbancia a 260 nm y el gradiente de fuerza iónica se muestra por la línea discontinua en mS/cm. En el gel de Agarosa al 0.7% se muestran: los marcadores de tamaño molecular (carril 1), el análisis extracto inicial (carril 2) y una muestra del pico de máxima absorbancia (carril 3).

Conclusiones. En una etapa de purificación por cromatografía a membranas de intercambio iónico se logró la captura del 90% del plásmido pcDNAEhpc112.

Agradecimiento. A la Dra. Esther Orozco del Departamento de Patología Experimental por la donación del plásmido pcDNAEhpc112 y al CINVESTAV-IPN por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Bibliografía.

- Zhang, S., Krivosheyeva, A., Nochumsom, S., (2003). Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion-exchange membrana capsules. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 254-249.
- Levy, MS., O'kennedy R., (2000). Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *TIBTECH* 18, 296-305.
- Madriz, X., Martinez, M. B., Rodríguez, M. A., Sierra, G., Martínez-Lopez, C., Riveron, A. M., Flores L. and Orozco, E. (2004). Expression in fibroblast in live animals of *Entamoeba histolytica* polipetides EhCP112 and EhADH112. *Microb.* 150, 1251-1260