

CARACTERIZACIÓN DE BANCOS CELULARES PROCARIOTES

Néstor O. Pérez, Margarita Campos e Igor Ferlan, San Esteban 88, Col. Santo Tomás, México, D.F.
C.P. 02020, FAX 01(55) 5352-7651, nestor.perez@probiomed.com.mx.

Palabras clave: *Bancos celulares*, *Escherichia coli*, *regulación sanitaria*

Introducción. Un banco celular esta formado por alícuotas de un cultivo homogéneo y forma el material inicial para la producción de proteínas recombinantes. Los bancos pueden estar formados por bacterias, levaduras, células de insectos o de mamíferos que expresan el producto deseado. La forma más practica de proveer el abasto celular para la producción de biomedicamentos es el sistema de lote semilla, este concepto esta basado en el uso de Bancos Celulares Maestros para generar Bancos Celulares de Trabajo. Existe la necesidad de caracterizar los bancos celulares para garantizar su seguridad, pureza y estabilidad. Este trabajo presenta diferentes metodologías que pueden ser usadas para caracterizar adecuadamente bancos celulares procariotes siguiendo lineamientos internacionales(1, 2).

Escherichia coli es la bacteria de elección para la clonación de genes y expresión de proteínas recombinantes. Hay un gran número de cepas derivadas tanto de *E. coli* K-12 como de *E. coli* B que son utilizadas actualmente, entre sus ventajas están que son los organismos más estudiados genéticamente, son fácilmente manipulables y se consideran vehículos seguros la ausencia de genes patogénicos conocidos (3) y otros factores patogénicos conocidos (4).

Metodología: Se desarrollaron algunas metodologías que permitieron caracterizar bancos celulares en su identidad , pureza y estabilidad.

Las pruebas de identidad incluyeron pruebas fenotípicas como crecimiento en medios diferenciales, comparación de los parámetros de crecimiento entre diferentes viales y la expresión de la proteína recombinante deseada confirmada por SDS-PAGE y Western blot. También se utilizaron pruebas de identidad genética incluyendo una prueba de PCR que detecta exclusivamente cepas derivadas de *Escherichia coli* K-12 (5). También se identificó al plásmido recombinante mediante su mapa de restricción.

Las pruebas de pureza utilizadas incluyeron crecimiento en medios diferenciales y selectivos que permitieran observar el crecimiento de bacterias contaminantes incluyendo Enterobacterias, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus sp.*, hongos y levaduras, así como la evaluación directa mediante la técnica de Gram.

Una parte muy importante fue la evaluación de presencia de fagos. Se evaluó la presencia tanto de fagos líticos como lisogénicos. Para los segundos se utilizó como inductor de la fase lítica Mitomicina C (6).

La estabilidad de las clonas recombinantes se evaluó en dos puntos importantes, primero directamente de los viales congelados y segundo al final de la fermentación.

Resultados y discusión: Las metodologías utilizadas fueron suficientemente poderosas como para caracterizar los bancos celulares. El uso de pruebas de identidad microbiológicas y genéticas garantiza la correcta autenticación de la clona. La producción específica de la proteína recombinante demostrada por SDS-PAGE y Western Blot es una prueba adicional de gran peso. El uso de diferentes medios para evaluar la pureza del banco es suficiente para garantizar la ausencia de otros microorganismos contaminantes. La prueba de ausencia de fagos y profagos tiene gran importancia para garantizar la inocuidad del banco. Los plásmidos recombinantes mostraron ser muy estables, durante la congelación de los viales y al final de la fermentación.

Conclusiones: La caracterización de un banco celular procariote debe tomar en cuenta tanto pruebas genéticas, como fenotípicas. El uso de pruebas microbiológicas clásicas y de biología molecular garantiza una caracterización completa.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo del Ing. Jaime Uribe para la presentación de este trabajo.

Bibliografía:

- 1.- International Committee on Harmonization. Analysis of the expression construct in cells used for production of rDNA derived protein products. 1997.
- 2.- International Committee on Harmonization. Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological /Biological products. 1995.
- 3.- Mühldorfer I, Hacker J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microb. Pathog. 1994;16:171-181.
- 4.- Chart H, Smith HR, La Ragione RM, Woodward MJ. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5^α and EQ1. J. Appl. Microbiol. 2000;89:1048-1058.
- 5.- Kuhnert P, Nicolet J, Frey J. Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains. Appl. Environ. Microbiol. 1995;61:4135-4139.
- 6.- Oakey HJ, Owens L. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. J. Appl. Microbiol. 2000; 89:702-709.