



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES

INMUNOGENICAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN *ESCHERICHIA COLI*.

Alejandra Dávila Truby, Pedro E. Navarro García, Clara Espitia, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Inmunología, Unidad de Bioprocesos. México D.F. CP 04360. ale_truby@hotmail.com, pedroemmanuel@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: proteínas recombinantes, tuberculosis, E. coli.

Introducción. Se ha demostrado que proteínas antigénicas de micobacterias patógenas como APA, ESAT-6 y CFP10 pueden ser empleadas como parte de una vacuna o diagnóstico contra la tuberculosis [1,2,3]. Por otra parte, la vacuna actual BCG tiene una eficacia reportada entre 0 y 80% y puede interferir con las pruebas de diagnóstico [4]. Cultivar *M. tuberculosis* para obtener estas proteínas es peligroso, lento y no aporta altas productividades, en cambio en *E. coli* se reducen los riesgos, su crecimiento es más rápido y existen muchos modelos de producción recombinante. que el uso de A nivel laboratorio se utilizan inductores químicos como IPTG mientras a escalas industriales se recurre a sistemas termoinducibles. Estas dos maneras de inducción producen un estrés que activa proteínas chaperonas de choque térmico [5]. En este proyecto se pretende producir tres inmunógenos de micobacterias en biorreactores controlados obteniendo altas productividades. Se estudiarán los procesos de adaptación tras una inducción continua por IPTG y su efecto sobre la producción de APA recombinante en cultivo continuo. Igualmente, se investigarán las respuesta de choque térmico y mediante estrategias de cultivo y moleculares se buscará contender con dicha respuesta para aumentar la productividad de ESAT-6 y CFP10.

Metodología. Se utilizaron tres cepas de *E. coli* Rosetta DE3 con un plásmido pET15b conteniendo las secuencias de APA, ESAT6 y CFP10 inducible por IPTG. Los cultivos se realizaron en matraces de 250mL o en un reactor de 10 L, controlando el pH 7.2, TOD > 20%, por cascada de agitación entre 200 a 800 rpm y 37°C. La producción se evalúa por densitometría de geles de SDS, ensayos de WB y purificación por afinidad a níquel. Adicionalmente, se utilizan cepas termoinducibles ATCC 53606 portando un plásmido de producción pDeltaBlue que contiene un promotor fuerte y finamente regulado.

Resultados. Tanto las cinéticas de crecimiento como la velocidad específica de crecimiento (μ) de las tres cepas en matraz agitado son muy similares [Tabla1]. Sin embargo, la producción difiere. Solamente se logró producir APA. En el biorreactor de 10 L, μ fue de casi la mitad comparada con matraces. La biomasa húmeda total obtenida fue de 60 g/L.



Fig. 1. Gel SDS-PAGE de una cinética de crecimiento. Se observa la producción de la proteína a distintas horas del cultivo en matraz.

La proteína purificada del biorreactor fue ~2 mg/g (de biomasa), en el caso de matraz fue 0.91 mg/g, 4.6% de la proteína total.

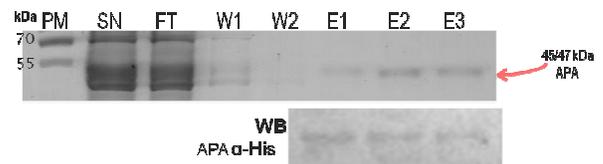


Fig. 2. SDS-PAGE electroforesis de 1.0 g de biomasa de 10 L. SN-Sobrenadante de lisado de células. FT- No-pegado, W- Lavados, E- Eluciones.

Tabla 1. Comparación de velocidades específicas de crecimiento y producción de las cepas productoras.

Cepa	μ (h^{-1})	Producción (mg/g)
APA (10L)	0.264	2.05
APA	0.595	0.91
ESAT6	0.409	-
CFP10	0.437	-

Conclusiones. La cepa productora de APA crece a una velocidad menor en biorreactor pero a una DO mayor y produce más proteína: alrededor de 12mg/L comparado con 3.6 mg/l en matraz. El siguiente paso es hacer un ensayo de adaptación de esta cepa bajo condiciones de inducción continua con IPTG. En el caso de ESAT6 y CFP10 no se observa producción. Como perspectivas del trabajo se diseñarán dos cepas termoinducibles con uso optimizado de codones.

Agradecimientos. CONACyT 82533 y 103393, 137854, PAPIIT-UNAM. IN228509.

Bibliografía.

- 1.- Romain et al 1993. PNAS 90(11): 5322-5326
- 2.- Ulrichs et al., 1998. European J of Immunol 24(12): 3949-58Valdez-
3. Renshaw et al., 2002. J Biol Chem 277(24): 21598-603Fine PE. 1995. Lancet 346: 1339-345
- 4.- Wang X, Barnes P.F., Dobos-Elder K.M., Townsend J.C., Chung Y., Shams H., Weis S.E. y Samten B. (2009). J Immunol 182 6: 3668-3677
- 5.- Cruz N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T. y Trujillo-Roldán M.A. (2010) Microb Cell Fact 9:18

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA