



OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA rVP2 DEL IPNV

Dedreka Gough-Miranda, Rocío Infante-Ramírez, Tania Siqueiros-Cendón, Blanca Sánchez-Ramírez,
María del Carmen González-Horta, Gilberto Erosa-de la Vega.

Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología II. Chihuahua
Chih. C.P 31125. Correo electrónico: gerosa@uach.mx

Introducción: La acuicultura es la técnica que permite aumentar la producción de organismos acuáticos para consumo humano, controlando tanto condiciones ambientales como propias de los organismos (1), un problema dentro de la acuicultura es la necrosis pancreática infecciosa (IPN), una enfermedad viral típica en salmónidos (2). La importancia de la proteína VP2 del IPNV radica en su localización, ya que se encuentra en la parte externa del virus y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes de tipo específico (4). A partir de las investigaciones de Milstein y Kohler ha habido un gran interés en la producción de anticuerpos, ya que pueden abrir nuevas posibilidades en el diagnóstico médico y químico (5). En el estado de Chihuahua la industria acuícola sufre pérdidas económicas debido a que la enfermedad no se detecta a tiempo en los peces, es por ello la importancia de producir anticuerpos contra la proteína VP2 ya que en la actualidad no existen dichos anticuerpos. El objetivo del trabajo fue obtener hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales contra la proteína rVP2.

Metodología: Se utilizaron ratones de 4-8 semanas de edad, manipulados bajo la NOM-062-ZOO-1999, inmunizados vía i.e con 20 µg de rVP2 obtenida en trabajos previos (No. Acceso AY026348) y se evaluó la presencia de anticuerpos contra el antígeno inyectado mediante la técnica de dot-blot. Para realizar la fusión celular (5) se utilizó la línea de mieloma P3X63-Ag8-653 y las células del bazo de ratones inmunizados con rVP2, en una proporción 2:1. Se seleccionaron los hibridomas productores de anticuerpos anti rVP2 por dot-blot y posteriormente los hibridomas candidatos fueron clonados 3 veces por el método de dilución limitante. Los anticuerpos fueron clasificados por medio de antiinmunoglobulinas (SIGMA) y la purificación del anticuerpo se llevó a cabo mediante columna de agarosa con proteína A.

Resultados: Se obtuvieron 12 clones de hibridomas con secreción estable de anticuerpos anti rVP2 (Figura 1). Se eligieron y caracterizaron 6 anticuerpos monoclonales contra la proteína rVP2 los cuales fueron llamados G8 IgG1, E8 IgG2b, C10 IgG3, D4 IgG1, H6 IgG2a y C11 IgG2a. Los anticuerpos se purificaron por medio de columna con proteína A utilizando SDS-

PAGE bajo condiciones reductoras, en donde se identificaron las cadenas correspondientes del anticuerpo obteniéndose una banda de 50 kDa, la cual corresponde a las cadenas pesadas y otra banda de 25 kDa la cual representa las cadenas ligeras del anticuerpo (Figura 2).

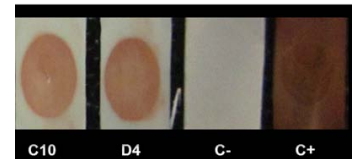


Figura 1: Tamizaje de hibridomas por dot blot después de la clonación por dilución limitante.

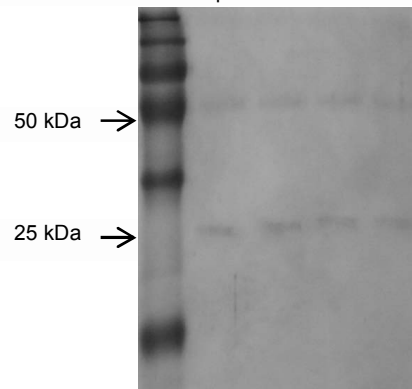


Figura 2: Purificación de anticuerpos. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de coomassie. Carril 1 MPM, carril 2-5 fracciones de Ac purificadas

Conclusiones: Se obtuvieron hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales contra la proteína rVP2 del IPNV a partir de la fusión celular entre el mieloma P3X63-Ag8-653 y células de bazo de ratón. Los anticuerpos caracterizados y previamente purificados se utilizarán en estudios posteriores a fin de obtener una prueba de diagnóstico rápida y así detectar el virus de la necrosis pancreática infecciosa a tiempo y evitar las pérdidas económicas en la industria acuícola.

Bibliografía:

1. Idyll C.P. (1974). México/PNUD/FAO
2. Salgado-Miranda C. (2006). *Vet. Mex.* Vol.37 N°4, p. 467-477.
3. Regenmortel M.H, Fauquet C.M, Bishop D.H.L, Carstens E.B, Estes M.K, Lemon S.M, Maniloff J, Mayo M.A, Mc Goech D.J, Pringle C.R, Wickner R.B. (2000). *Acad Press*, p. 1162.
4. Duncan R, Mason C, Nagy E, Leong J, Dobos P. (1991) *J. of Virology* Vol. 61, p. 3655-3664
5. Kohler, G., Milstein, G. (1975). *Nature*, Vol 256, p. 495-497.