

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES UTILIZANDO UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DERIVADA DEL GENOMA DE *ANAPLASMA MARGINALE*

Paola Cervantes-Barrera², Itzel Amaro Estrada*¹, Elizabeth Salinas-Estrella¹, Mayra Cobaxin-Cárdenas¹, David Bustamante-García², Sergio Rodríguez-Camarillo¹.

¹Laboratorio de Anaplasmosis, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, Jiutepec, Morelos, 62574, ²Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Jiutepec Morelos, 62550.

*amaro.estrada@gmail.com, paolacervantes0905@gmail.com

Palabras clave: Proteínas recombinantes, Anaplasmosis, Inmunógenos.

Introducción. La anaplasmosis bovina es una enfermedad es causante de millonarias pérdidas anuales en el sector pecuario, y en México se asocia a la bacteria gram negativa *Anaplasma marginale*. La enfermedad se caracteriza por pérdida de peso y disminución de producción de leche, fiebre, anemia e ictericia. *A. marginale* puede ser transmitida por garrapatas, de madre a cría, por algunos insectos hematófagos y por utensilios contaminados (1). La anaplasmosis bovina se presenta sobretodo en regiones tropicales y subtropicales; en México y otros países, no existen alternativas comerciales para el control de la enfermedad. La proteína hipotética AM592 identificada en el genoma de la cepa St. Maries (2) ha sido propuesta como molécula vacunal, dado que es una proteína que no muestra cambios en las diferentes cepas analizadas, y las predicciones bioinformáticas indican que contiene epítopos lineales tipo B, siendo posible que tenga propiedades inmunogénicas (3). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la expresión recombinante de un fragmento derivado de esta proteína, así como su uso para la generación de anticuerpos policlonaes lo que abre la posibilidad de detectar la proteína nativa AM592.

Metodología. Las cepas BL21(DE3) y pLysS de *E. coli* se transformaron con la construcción pET-22b(+)-HP592Mex¹⁶⁻²⁴⁴ y una vez confirmada la secuencia se llevó a cabo la expresión en matraces con medio LB líquido y ampicilina (100 µg/mL). Los matraces fueron inoculados con el preinóculo en una relación 1:100 e incubados a 37 °C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5, entonces se agregó 1 mM de IPTG para inducir la producción de la proteína. Los cultivos se incubaron a 30 °C en agitación a 200 rpm por al menos seis horas. Se obtuvieron los pellets celulares por centrifugación y se realizó choque osmótico para recuperar el contenido de la región periplásmica de las bacterias, ya que la construcción incluye un péptido pelB. Los paquetes celulares restantes se resuspendieron en solución de lisis (50 mM NaH₂PO₄ pH8, 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol, 10 % de Glicerol), y se realizaron cinco ciclos

de sonicación a una frecuencia de 30 kHz. La purificación de la proteína se realizó por cromatografía de afinidad (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) bajo condiciones nativas y desnaturalizantes siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las fracciones recuperadas fueron analizadas por electroforesis TRICINE-SDS-PAGE utilizando tinción con azul de Coomassie e inmunodetección dirigida a la etiqueta de histidinas. Se llevó a cabo la inoculación de tres conejos con una mezcla homogénea de la proteína recombinante HP592Mex¹⁶⁻²⁴⁴ y adyuvante oleoso. Se recolectaron muestras previas y posteriores a la inoculación para monitorear la producción de anticuerpos. Una vez completado el esquema, se analizaron los sueros por ELISA.

Resultados. En los análisis de SDS-PAGE observó un producto de aproximadamente 26 kDa, que podría corresponder al fragmento HP592Mex¹⁶⁻²⁴⁴, lo que se confirmó al utilizar un anticuerpo específico para la etiqueta de histidinas. Posterior a la inoculación de los conejos se evaluaron los sueros policlonaes; los tres conejos generaron anticuerpos que reconocen a la proteína recombinante con diferentes niveles de respuesta.

Conclusiones. Se obtuvo la proteína recombinante en un sistema bacteriano y es reconocida por anticuerpos policlonaes generados en conejo.

Agradecimiento. Este trabajo es derivado del proyecto SIGI 1515235065 financiado con Fondos Fiscales INIFAP.

Bibliografía.

1. Amaro I, García MA, Preciado JF, Rojas EE, Alpírez F, Hernández R, Vega CA, Rodríguez S. (2014) *INIFAP Folleto Técnico* Núm. 8.
2. Brayton, KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 844–9.
3. Cano TB. (2014) Tesis, Universidad Politécnica del Estado de Morelos.