

ESTUDIO DE ULTRAFILTRACIÓN TANGENCIAL DE LISADOS MECÁNICOS DE *E. COLI* PARA LA RECUPERACIÓN DE PLÁSMIDO

Jennifer Selena Ramírez-Puerta^a, Patricia Guerrero-Germán^a, Armando Lucero-Acuña^a, Jaime Ortega-López^b, Armando Tejeda-Mansir^c. ^a Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. 83000.

^b Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Ciudad de México. 0736. a214212213@unison.mx

Palabras clave: ultrafiltración tangencial; filtración de lecho profundo; lisis mecánica.

Introducción. La rápida evolución de las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) y terapia génica ha incrementado el interés en producir grandes cantidades de ADNp grado farmacéutico (1). La primera etapa del bioproceso, después de la fermentación es la lisis de la *Escherichia coli* hospedera del ADNp. Al realizar la lisis alcalina en (*E.coli*), se producen flóculos y precipitados, que es necesario eliminar para obtener un lisado clarificado (2). Típicamente esta clarificación se realiza por centrifugación, también se ha estudiado la filtración de lecho profundo (3). Otro método probado para la clarificación de lisados alcalinos es la ultrafiltración tangencial. Recientemente se han utilizado métodos mecánicos de ruptura celular para obtener un lisado sin la utilización de agentes químicos (4). Un lisado mecánico por molienda con perlas contiene entre los contaminantes ADN genómico (ADNg), restos celulares y perlas. En esta investigación se estudió la clarificación de un lisado mecánico para eliminar los contaminantes, que son de distintos tamaños a los contaminantes de un lisado alcalino, mediante filtración de lecho profundo y ultrafiltración tangencial.

Metodología. La cepa *E. coli* DH5 α hospedera del plásmido pVAX1-NH36 se propagó en medio de cultivo TB se suplementó con 0.05 g/L de kanamicina. El cultivo se realizó a 37°C y 300 rpm por 12 horas. La biomasa obtenida por centrifugación (Biofuge Stratos) se sometió una parte a lisis mecánica y la otra a lisis alcalina. Para realizar la lisis mecánica se utilizó un molino mezclador (Retsch) y perlas de zirconio (200 y 400 μ m). La velocidad de agitación fue de 30 Hz y el tiempo de molienda fue de 4 minutos por muestra. La lisis alcalina se realizó mediante un tratamiento reportado por Diogo et al. (5) y se clarificó mediante centrifugación. El lisado mecánico se clarificó por filtración de lecho profundo con un filtro de 1.2 μ m. Posteriormente en el equipo KrosFlo Research II de ultrafiltración de flujo tangencial (UFT) con una membrana de 750 kDa se diafiltró el lisado mecánico clarificado, en cada etapa de lavado se agregó al retenido un volumen de buffer Tris 10 mM igual al

volumen permeado. Se analizó la calidad del ADNp en los permeados y retenidos de cada lavado, mediante análisis electroforéticos y cromatográficos.

Resultados.

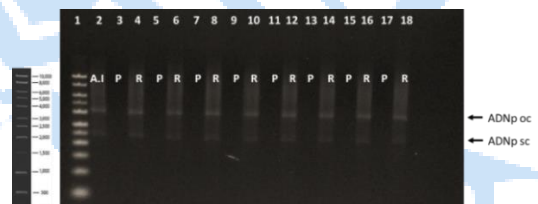


Fig. 1. Electroforesis de permeados (P) y retenidos (R) en la diafiltración por UFT.

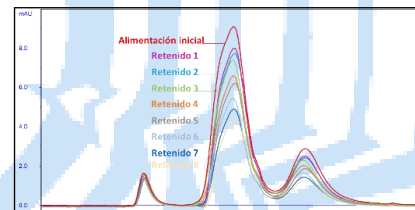


Fig. 2. Cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado en la diafiltración por UFT.

Conclusiones. Se verificó que en la UFT el ADNp se mantiene en los volúmenes de retenido, no logró transitar al permeado, posiblemente por la formación de una capa con fragmentos de ADNg en la membrana de UFT, también se logró una disminución de impurezas, fluyendo éstas al permeado.

Agradecimiento. Agradezco a Conacyt por la beca otorgada durante esta investigación.

Bibliografía.

- Liu, M. (2019). *Vaccines (Basel)*. Vol.(2): 37.
- Prazeres, D., Monteiro, G., Ferreira, G., Diogo, M., Ribeiro, S., & Cabral, J. (2001). *Biotechnology Annual Review*, Vol. (7): 1-30.
- Padilla, A., Guerrero, P., & Tejeda, A. (2015). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol. (38):1091–1096.
- Padilla, A., Lucero, J. A., Guerrero, P., Ortega, J., & Tejeda, A. (2018). *Applied Science*. Vol. (8):30.
- Diogo, M., Queiroz, J., Prazeres, D. (2003). *J. Chromatography A*. Vol. (998): 109–117.