

## MEJORAMIENTO DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PORINA OmpD A PARTIR DE *Salmonella Typhimurium*

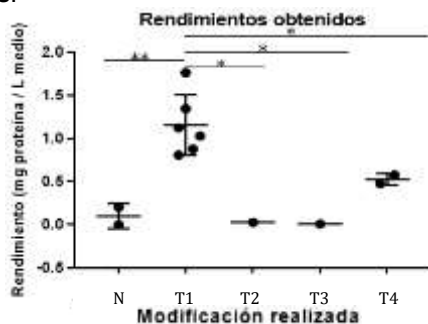
Jessica Sánchez<sup>a</sup>, Carlos Orozco<sup>b</sup>, Constantino López<sup>a</sup>, <sup>a</sup>UIMIQ, IMSS, Ciudad de México, cp. 06720, <sup>b</sup>UPIBI, IPN, Ciudad de México, cp. 07340, jessica.sanchezvarg@gmail.com

*Palabras clave:* producción, porinas, *Salmonella Typhimurium*

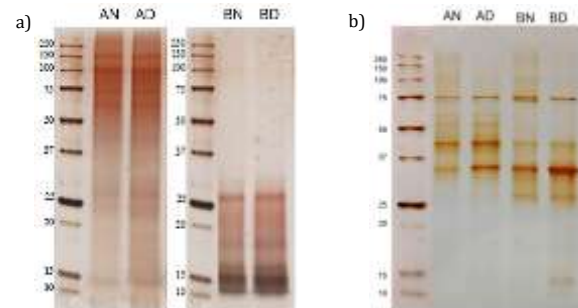
**Introducción.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es el agente causal de la salmonelosis no tifoidea (SNT), enfermedad que presenta 93.8 millones de infecciones y deriva en 155,000 muertes anualmente (1). Adicionalmente, personas inmunocomprometidas son susceptibles a su forma invasiva (SNTi), que genera más de 681,000 muertes por año (2). No existe vacuna contra la SNT y SNTi. La porina OmpD es un candidato para el desarrollo de una vacuna contra estas enfermedades por ser el blanco principal de la respuesta protectora (3). Sin embargo, el método de producción y purificación utilizado actualmente no presenta un alto rendimiento ni suficiente grado de pureza para evaluar la capacidad protectora de esta vacuna experimental. El objetivo del presente trabajo fue mejorar el rendimiento y el nivel de pureza de los lotes de porina OmpD producidos a partir de dos cepas recombinantes de *S. Typhimurium*.

**Metodología.** El proceso de producción en general consiste en: i) Suspensión y lisis de la bacteria, ii) Centrifugación iii) Incubación con DNasa y RNasa, iv) Ultracentrifugación v) Extracción de membrana externa método de Nikaido (4), vi) Purificación por cromatografía de exclusión molecular. Modificaciones al proceso productivo de los lotes producidos a partir de la primera cepa: omisión de la centrifugación, adición de SDS al 2% (solubilizante), disminución de la velocidad y tiempo de centrifugación. Para la segunda cepa se estableció el flujo y volúmenes de operación de una columna de cromatografía por exclusión molecular (XK50/100, GE) y se experimentaron variaciones en la forma de operación: flujo de elución, purificación de lotes individuales y re-purificación de lotes. El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples ( $\alpha=0.05$ ), así como las pruebas t-Student ( $\alpha=0.05$ ) se realizaron con el software NCSS 12.

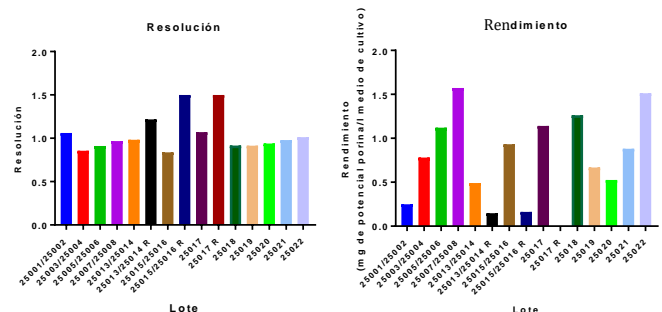
### Resultados.



**Fig. 1.** Rendimientos de los lotes obtenidos. N: Ninguna, T1: Omisión de la centrifugación, T2: SDS 2% y 2 pasos de Nikaido, T3: SDS 2% y 3 pasos de Nikaido, T4: Disminución de tiempo y velocidad de centrifugación. \*  $p < 0.1$ , \*\*  $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Pureza de lotes obtenidos. Fracciones A y B en sus formas nativas (N) y desnaturalizadas (D) de a) Lote sin modificación en la metodología, b) lote con omisión del paso de centrifugación.



**Fig. 3.** Resolución y rendimiento obtenidos de los lotes purificados. Lotes unidos por "R" se purificaron juntos. R: Lotes re-purificados.

**Conclusiones.** Se incrementó el rendimiento de producción de la porina OmpD en un 569% (de 0.204 a 1.160mg L<sup>-1</sup> de medio de cultivo) mediante la omisión de la centrifugación tras la lisis celular en comparación con los lotes iniciales. La purificación de lotes individuales genera un mejor balance entre resolución y rendimiento, mejorando también el grado de pureza, en comparación con los lotes purificados en pares. No es viable la re-purificación de lotes ni la operación a flujos de elución menores a 5mL min<sup>-1</sup> durante la cromatografía por exclusión molecular.

### Bibliografía.

- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. (2010). Clin Infect Dis. 50(6):882–9.
- Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. (2015) Emerg Infect Dis. 21(6):941–9.
- Pérez-Toledo M, Martínez-Amador PA, Pastelin-Palacios R, Isibasi A, Cunningham AF, López-Macias C. (2016). Gac Med Mex. (152):5–13.
- Nikaido H. (1983). Methods Enzymol. 97:85–100.