

ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A, PARTIENDO DE UNA CEPA DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE

José E Brito, Nuria Reyes, Gabriel J Márquez, Yurkins Tejero, Enrique Pérez, Giovany Reyes, Alain Martínez, Diamilé González, Raysa Vázquez, Jorge Sotolongo, María Lourdes Villalonga, Edurnes Marquetti, Luis Trujillo, Ernesto González, Irén García, Omar García, Enrique Duranh y Sergio Pérez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado Postal 6162, C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono:(53-7) 21-84-66.

Introducción

La proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA), es una herramienta muy usada en un gran número de técnicas inmunológicas y de diagnóstico. Es utilizada en la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad (1), la interacción SPA-IgG es destruida por disminución del pH o por el uso de agentes caotrópicos como el KSCN (2).

A partir de un clon de *E. coli* productor de la región de la proteína A responsable de la unión a IgG, y de fermentaciones con rendimientos entre un 15 y un 25 % de la proteína total, se desarrolló un proceso productivo de dicha proteína, en el cual se obtiene un alto grado de pureza en la preparación final, eliminándose la necesidad del uso de cromatografía de afinidad con IgG inmovilizada, la cual eleva grandemente el costo de producción de dicha proteína.

Materiales y Métodos

La cepa de *E. coli* HB 101 fue utilizada como hospedero de dos plásmidos, el pPCITS utilizado para regular el promotor P_R y el pPA3, portador del gen con las 5 regiones responsables de la unión a IgG de la proteína A.

El cultivo es crecido en medio LB a 30 °C hasta DO₆₀₀ de 0,6 y posteriormente la temperatura es elevada hasta 42 °C, manteniéndolo en estas condiciones durante 3 h.

El proceso de purificación desarrollado parte de 100 g de biomasa chequeada por SDS-PAGE y densitometría para un porcentaje de SPA no menor

del 15 %. Posteriormente se realiza una ruptura a través de Prensa Francesa y ultrasonido.

Las etapas de semipurificación posteriores incluyen una precipitación ácida y precipitaciones a 2 % de sulfato de amonio (35 y 60).

En el primer paso cromatográfico la muestra es sometida a un desalado mediante el uso de G-25 utilizando una columna BP 100/500, monitoreando A₂₈₀ y conductividad. Posteriormente se realiza una cromatografía en DEAE-Sepharose. La elución es en forma de gradiente lineal salino (0-0,25 M de NaCl). La preparación final obtenida es sometida a una filtración esterilizante y liofilizada para su almacenamiento.

Resultados

El proceso de purificación así desarrollado brinda un rendimiento promedio del 53 % de la proteína A total de partida, y un grado de purificación de 4,4 veces. Los resultados mostrados constituyen el promedio de cuatro lotes consecutivos (Tabla 1).

Mediante SDS-PAGE, análisis densitométrico y Western-Blot, se demuestra que las preparaciones proteicas finales poseen un grado de pureza superior al 95 %, mostrando además, resultados similares a preparaciones de proteína A patrones, cuando son empleadas en técnicas inmunológicas como la inmunodifusión radial y el Dot-Blot.

El proceso establecido brinda una preparación final de calidad elevada, con un alto grado de pureza y apta para su uso en técnicas inmunológicas y de diagnóstico.

1. Hjelm H, et. al. Eur J Biochem 1975; 57:395-403.

2. Kronvall G, Seal US, Finstad J, Williams RC Jr. J Immunol 1970;104:140-147.

Tabla 1. Purificación promedio para cuatro lotes de SPA.

No. Etapa	Vol. (mL)	Conc. (mg/mL)	SPA (%)	P. tot. (mg)	SPA tot. (mg)	Rend. (%)	G.P. (veces)
1 Crudo	270,0	57,4	22,9	15494,5	3564,6	100,0	1,0
2 P Pon ácida	383,8	18,1	43,3	6821,9	3135,7	90,8	2,0
3 Amonio y G 25	505,3	3,9	84,2	2462,5	2083,1	63,3	3,9
4 Final (DEAE y conc)	205,0	9,9	96,2	1880,7	1809,2	53,2	4,4