



*"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"*

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ESTUDIO DE LA ETAPA DE PURIFICACIÓN FINAL EN EL PROCESO DE
PRODUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO APLICANDO
CROMATOGRAFÍA EN MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

ADÁN GUTIÉRREZ OBESO

HERMOSILLO, SONORA

NOVIEMBRE 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 11 de Noviembre de 2011.

M.C. JESÚS LEONEL SERVÍN RODRÍGUEZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO
INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

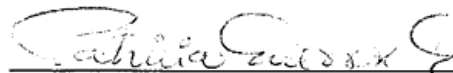
Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "ESTUDIO DE LA ETAPA DE PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO APLICANDO CROMATOGRAFÍA EN MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO", presentada por:

ADÁN GUTIÉRREZ OBESO

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

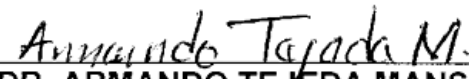
Ingeniero Químico

11 nov 2011
Fecha



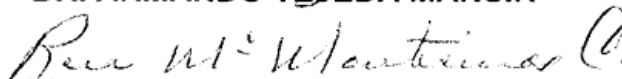
DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN

11/11/11



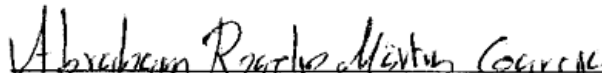
DR. ARMANDO TEJEDA MANSIR

11 nov 2011



DRA. ROSA MARÍA MONTESINOS CISNEROS

11/Noviembre/2011



DR. ABRAHAM ROGELIO MARTÍN GARCÍA

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar a este momento. Con toda mi gratitud a la Universidad de Sonora. Mi agradecimiento al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia así como al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. A mis padres Margarito Gutiérrez y María Guadalupe Obeso que sin su apoyo y guía esto no sería posible, mis hermanos por el ejemplo brindado, a todos mis compañeros y amigos por manifestarme una franca amistad, también agradezco profundamente a Alejandra Figueroa Rosette por su invaluable aportación y compañía en la realización de este proyecto, así como a mis maestros y sinodales por su gran labor académica y todas las atenciones prestadas para la culminación de este trabajo.

RESUMEN

La terapia génica y la vacunación se han colocado entre los avances biotecnológicos más inquietantes y prometedores, además de la comprensión cada vez mayor, del papel de varios genes relacionados a ciertas enfermedades. Ambas técnicas están basadas en los mismos principios, en la introducción de genes en células humanas que codifican para una proteína ausente o defectuosa (en el caso de terapia génica) o para una proteína antigénica (en el caso de vacunas de ADN. Estos genes son transportados por medio de un vector que es el ADN plasmídico (ADNp). Sin embargo, debido a su eficacia, se requieren de dosis relativamente grandes de ADNp. Por lo tanto, es de suma importancia tener un proceso eficaz y eficiente a escala industrial con el fin de cubrir esta demanda. Un proceso estándar sigue las etapas de propagación celular, recuperación primaria, captura y purificación final del ADNp. La cromatografía es la operación unitaria ampliamente utilizada para ésta última etapa del proceso, debido a que proporciona alta resolución, utiliza productos químicos que generalmente se consideran seguros y son fácilmente escalables. Entre estas técnicas se encuentra la cromatografía por intercambio iónico, que se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados de los adsorbentes utilizados.

En el presente trabajo, se utilizó como macromolécula modelo el plásmido pVAX1 con el gen insertado LipL-32. La purificación se logró con un sistema de cromatografía de flujo frontal en membranas de intercambio iónico Mustang Q coin seleccionando las condiciones de operación adecuadas: Se obtuvo que alimentando la solución de retenido a 0.5 M se incrementó la capacidad de carga de la columna. El lavado se realizó con buffer TE con la misma molaridad y la elución primero isocrática y luego con gradiente hasta 2.4 M se consiguió la remoción de ARN del retenido obtenido de la etapa previa de pre-purificación llevada a cabo por medio de ultrafiltración de flujo tangencial.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | i |
| Agradecimientos | i |
| RESUMEN | i |
| CONTENIDO | ii |
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| LISTA DE TABLAS | vi |
| | |
| CAPÍTULO I | 1 |
| INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| 1.1 Introducción | 1 |
| 1.2 Objetivo General | 2 |
| 1.3 Objetivos Específicos..... | 2 |
| | |
| CAPÍTULO II | 3 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos | 4 |
| 2.2 Especificaciones de calidad del plásmido | 6 |
| 2.3 Características del pVAX1-LipL32..... | 6 |
| 2.4 Descripción del Proceso de Producción y Purificación de ADNp..... | 7 |
| 2.4.1 Fermentación | 7 |
| 2.4.2 Recuperación Primaria..... | 9 |
| 2.4.3. Recuperación Intermedia..... | 11 |
| 2.4.4 Purificación Final | 12 |
| 2.4.5 Electroforesis Convencional..... | 21 |
| 2.4.6 Espectrofotometría | 23 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 3.1 Materiales | 24 |
| 3.2. Equipo | 25 |
| 3.3 Metodología | 30 |
| 3.3.1 Fermentación | 30 |
| 3.3.2 Recuperación Primaria..... | 31 |
| 3.3.3 Recuperación Intermedia..... | 31 |
| 3.3.4 Purificación..... | 32 |
| 3.3.5 Control de calidad del ADN plasmídico..... | 36 |
| | |
| CAPÍTULO IV | 38 |
| RESULTADOS Y DISCUSION | 38 |
| 4.1 Fermentación | 38 |
| 4.2 Recuperación Primaria | 38 |
| 4.3 Recuperación Intermedia..... | 39 |
| 4.3 Purificación Final | 42 |
| 4.3 Control de Calidad del ADN plasmídico | 58 |
| | |
| CAPÍTULO V | 59 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 59 |
| 5.1 Conclusiones | 59 |
| 5.2 Recomendaciones | 60 |
| | |
| REFERENCIAS | 61 |
| ANEXOS | 65 |
| ANEXO A. Preparación de Soluciones | 65 |
| ANEXO B. Información de seguridad: Bromuro de etidio | 66 |
| ANEXO C. Información técnica de membranas de Intercambio iónico | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática del ADN plasmídico. a) plásmido lineal, b) plásmido circular abierto, c) plásmido superenrollado, d) Dímero u oligomérico, e) plásmido desnaturalizado..... | 5 |
| Figura 2. Representación esquemática del vector pVAX1-LipL32. | 7 |
| Figura 3. a) Curva típica de crecimiento de una Fermentación por lotes; b) Fermentación por lote alimentado. | 9 |
| Figura 4. Esquema representativo de la separación en los distintos métodos de cromatografía por adsorción | 15 |
| Figura 5. Principios de Separación en Cromatografía de Intercambio Iónico..... | 16 |
| Figura 6. Etapa 1, equilibrio en la columna empacada. | 17 |
| Figura 7. Etapa 2, aplicación de la muestra a la columna. | 17 |
| Figura 8. Etapa 3, primera elución..... | 18 |
| Figura 9. Etapa 3, segunda elución | 18 |
| Figura 10. Etapa 3, tercera elución..... | 19 |
| Figura 11. Etapa 4, lavado de la columna..... | 19 |
| Figura 13. Membrana Mustang Q coin en el empaque del fabricante | 25 |
| Figura 14. Incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR. | 25 |
| Figura 15. Centrífuga Allegra X-22, Beckmam Coulter. | 26 |
| Figura 16. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE. | 27 |
| Figura 17. Columna Pharmacia Biotech..... | 27 |
| Figura 18. A: Sistema de computo con el software BioLogic HR; B: Cromatografo BioRad Biologic HR; C:Colector de fracciones BioRad modelo 2128 | 28 |
| Figura 19. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía..... | 28 |
| Figura 20. EquipoMulti –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad..... | 29 |
| Figura 21. Proceso de purificación de plásmidos a partir de la cepa hospedera. | 30 |
| Figura 22. Diagrama de flujo de la etapa de purificación del ADNp | 32 |
| Figura 23. A:Membranas Mustang Q Coins desempacadas; B: Soporte de polipropileno; C: Sacabocados de 0.5 cm de diámetro; D: Corte de membranas por medio del sacabocados..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 24. A: Columna Pharmacia Biotech B: Columna empacada con las membranas mustang Q y los soportes de polipropileno; C: Columna empacada acoplada al cromatografo BioRad BioLogic HR | 34 |
| Figura 25. Diagrama de bloques de la etapa experimental para la purificación final del ADNp, por medio de cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico..... | 36 |
| Figura 26. Gel de electroforesis de muestras de lisado. | 39 |
| Figura 27. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 KDa y flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. | 40 |
| Figura 28. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 500 kDa..... | 41 |
| Figura 29. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa A..... | 43 |
| Figura 30. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa A. | 44 |
| Figura 31. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 4 mL de solución de retenido, utilizando el Programa B..... | 45 |
| Figura 32. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa B | 46 |
| Figura 33. Perfil de adsorción del retenido con 0.5M NaCl, utilizando el Programa C. | 47 |
| Figura 34. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa C..... | 48 |
| Figura 35. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 1.5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa D. | 49 |
| Figura 36. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa D. | 50 |
| Figura 37. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 1.5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa E..... | 51 |
| Figura 38. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa E..... | 52 |
| Figura 39. Cromatograma programa E multiples corridas | 53 |
| Figura 40. Perfiles de adsorción y lavado de solución concentrada y acondicionada de plásmido recuperado, utilizando el Programa F..... | 55 |
| Figura 41. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa F..... | 55 |
| Figura 42. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 4 mL de solución concentrada y acondicionada de plásmido recuperado, utilizando el Programa G | 56 |
| Figura 43. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa G. | 57 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Sistemas de administración para vacunas de ADN. | 4 |
| Tabla 2. Propiedades Biofísicas del ADNp. | 4 |
| Tabla 3. Principios de separación en cromatografía por adsorción | 14 |
| Tabla 4. Descripción de los Programas de Cromatografía de intercambio iónico | 35 |
| Tabla 5. Resultados espectrofotometría | 58 |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los virus inactivados han sido por muchos años el vector para transportar la información genética a las células, en las vacunas tradicionales. En este sentido los vectores no-virales han sido considerados una alternativa a los vectores virales desde los estudios pioneros describiendo la inyección directa de ADN plasmídico (ADNp) en ratones, seguida por la expresión del gen asociado *in vivo* [1], a partir de esos estudios se ha producido un rápido avance en la terapia génica basada en plásmidos y en el desarrollo de vacunas de ADN [2-4]. La terapia con ADN plasmídico ha demostrado ser relativamente barata y segura de administrar. Además, el ADNp posee estabilidad a temperatura ambiente, lo que hace que las vacunas de ADNp, comparadas con las vacunas virales posean una ventaja importante durante almacenamiento a largo plazo [4,5]. Sin embargo, debido a su eficiencia, se requieren de dosis relativamente grandes de ADN plásmido [6,7] por lo general en el orden de miligramos para el tratamiento completo de un paciente [5,8].

Las vacunas basadas en DNA que transportan genes, pueden producir inmunidad para enfermedades contagiosas para las cuales no existen vacunas aún, o su costo es muy elevado, como la malaria, hepatitis B, influenza y SIDA. Mientras que la terapia génica consiste en la introducción de uno o más genes funcionales, como una forma de prevención, tratamiento o cura de defectos genéticos tales como la hemofilia y la fibrosis quística, o enfermedades adquiridas como el cáncer, problemas vasculares y desórdenes neurológicos [9]. Por lo tanto, es de suma importancia tener un proceso eficaz y eficiente a escala industrial con el fin de cubrir la demanda de ADNp. Entre los numerosos métodos disponibles para la purificación de plásmidos, las técnicas cromatográficas son ampliamente adoptadas debido a que proporcionan alta resolución, manejan productos químicos que generalmente se consideran seguros y son

fácilmente escalables [4,5,7]. El método más común es la cromatografía de intercambio iónico que se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados de los adsorbentes utilizados en esta [5,9,10].

1.2 Objetivo General

Estudiar y determinar las condiciones de operación de la etapa de purificación final basada en cromatografía en membranas de intercambio iónico, a partir de las etapas de fermentación, recuperación primaria y recuperación intermedia de un bioproceso para la producción de DNA plasmídico de cultivos de *E. coli*.

1.3 Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de operación (fuerza iónica de la solución alimentada, tiempo) de la etapa de adsorción en la cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico.
- Establecer las condiciones de operación de la etapa de lavado (concentración de buffer de lavado, tiempo y características de lavado) en la cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico.
- Establecer las condiciones de operación la etapa de elución (concentración de buffer de elución, tiempo y características de elución) en la cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

El surgimiento de la terapia génica a finales de la década del setenta y el hallazgo que evidenció la factibilidad del empleo de ADN plasmídico para transfectar directamente células animales *in vivo* [1], a principio de los años noventa, constituyeron el punto de partida para el desarrollo de una nueva tecnología: la inmunización con ADN desnudo. El empleo de moléculas de ADN plasmídico con fines terapéuticos o como vacunas hacen que los conceptos de pureza que se tenían se ampliaran. Además, la necesidad de contar con cantidades de producto que satisfagan un mercado potencial hace que los procesos de obtención utilizados deban lograr ser escalados con facilidad y garanticen el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas de laboratorio o GMP y GLP respectivamente por sus siglas en inglés.

La terapia génica es la inserción de genes, que son transportados por ADNp, en células de los tejidos biológicos de un individuo con el fin de tratar cierta enfermedad, por ejemplo algún tipo de cáncer donde alelos mutantes nocivos son sustituidos por otros funcionales. Este tipo de terapia puede ser utilizada de muchas maneras por ejemplo [11]:

- Reemplazar los genes faltantes o defectuosos.
- Introducir genes que aceleran la destrucción de células cancerosas.
- Suministro de genes para que las células de cáncer puedan volver a la normalidad.
- Proporcionar genes que promuevan o impidan el crecimiento de nuevo tejido.
- Introducir genes que estimulan la curación del tejido dañado.

Tabla 1. Sistemas de administración para vacunas de ADN. [11]

| | |
|----------------------------------|---|
| Intramuscular | Inyección directa de ADN desnudo en el musculo. El ADN es captado por las células musculares. |
| Pistola de Genes | Impulsa plásmido revestido en oro dentro de las células. Algunos plásmidos son absorbidos por el núcleo. |
| Complejos de ADN | Se realiza un complejo de ADN con liposomas. Protege al ADN de la degradación. |
| Electroporación | Utiliza pulsos cortos de corriente eléctrica para mejorar la distribución del ADN. Permite a los plásmidos entrar pasiva y directamente en el citoplasma de la célula. |
| Sistemas de Entrega Viral | ADN que codifica para el antígeno se clona en un vector del virus, él huésped se infecta con muestra atenuada. |

2.1 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos

Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que aparecen en el citoplasma de algunos procariontes. Son de tamaño variable aunque menor que el cromosoma principal. El tamaño del plásmido varía de dos a más de 200 kilopares de bases, es de gran peso molecular ($>10^6$ Dalton) y tamaño (0.1 – 0.3 μm), muestra un alto contenido de carga negativa, el fosfato es su columna vertebral ya que presenta enlaces fosfodiéster. En la Tabla 2 se puede observar un concentrado de las propiedades biofísicas del ADNp.

Tabla 2. Propiedades Biofísicas del ADNp. [11].

| Característica | Plásmido |
|-----------------------------------|-----------------|
| Bloques de Construcción | Nucleótidos |
| Masa Molecular (Da) | $10^5 - 10^6$ |
| Radio de Stokes | 100-300nm |
| Carga | Negativa |
| Coefficiente de Difusión | Bajo |
| Viscosidad | Alta |
| Sensibilidad a la Fuerza de Corte | Alta |

Los plásmidos pueden aparecer en cinco conformaciones espaciales:

- a) Lineal: Tiene terminales libres, resulta del rompimiento químico de los enlaces fosfodiéster de cadenas de ADN opuestas.
- b) Circular abierto o relajado: Rompimiento de una cadena.
- c) Superenrollado: Se forma cuando el eje de la hélice del ADNp se encuentra enrollado en el espacio, formando una estructura de alto orden, es la isoforma más compacta y se considera que es más activa. Esta estructura es más estable y efectiva en transfección celular que las otras, por lo que en una preparación de ADNp para aplicación terapéutica debe contener al menos el 95 % de esta isoforma.
- d) Dímero (Oligomérico): Este plásmido es consecuencia de recombinación homóloga.
- e) Desnaturalizado: Conformación donde el enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias con cierta ubicación ha sido interrumpido. La desnaturalización resulta de arreglos en la estructura de la hélice del ADN, la cual generalmente depende del ambiente que lo rodea (pH, fuerza iónica y temperatura), por ejemplo a pH mayores de 13, el ADNp se desnaturaliza. [11, 12].

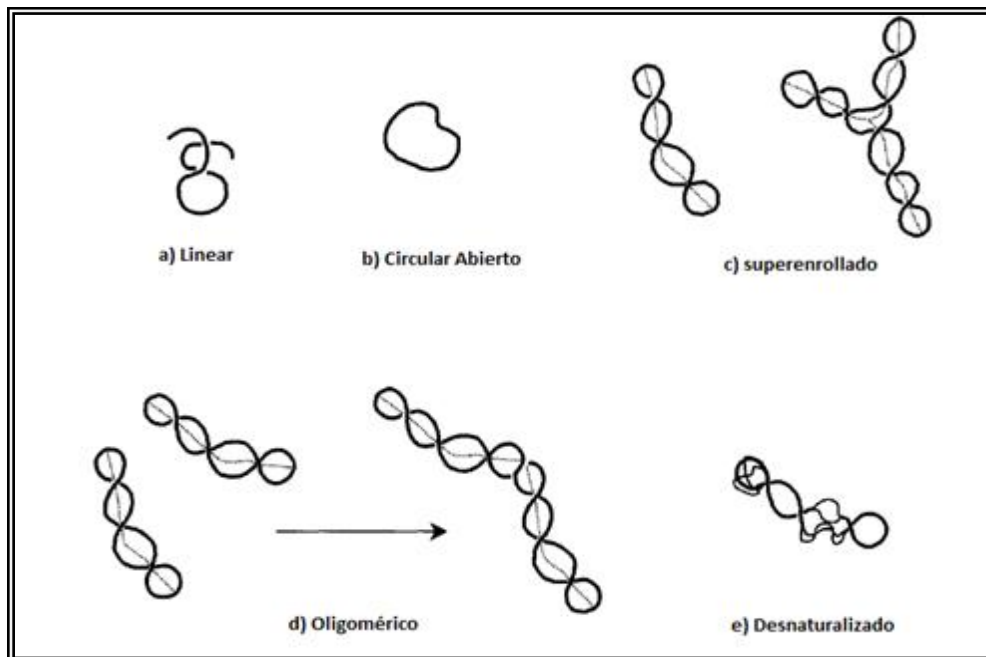


Figura 1. Representación esquemática del ADN plasmídico. a) plásmido lineal, b) plásmido circular abierto, c) plásmido superenrollado, d) Dímero u oligomérico, e) plásmido desnaturalizado (Adaptado de Prazeres *et al.*, 2001).

2.2 Especificaciones de calidad del plásmido

El proceso de producción de ADN para vacunas en seres humanos, debe diseñarse de manera que se obtenga un plásmido con las especificaciones de calidad establecidas para este tipo de producto. La pureza, identidad, eficacia, resistencia y seguridad son aspectos fundamentales que se deben tener en cuenta. Al igual que en otros productos, la potencia y la seguridad se relacionan con la pureza, debido a que los contaminantes pueden inducir efectos no deseados o no específicos del producto. Si bien algunos de estos requerimientos no pueden ser establecidos *a priori*, como las dosis y la ruta en que debe aplicarse el ADN plasmídico, existen regulaciones que se deben observar y cumplir [13]. Los ensayos de actividad biológica se deben realizar con el objetivo de comparar, *in vitro*, el producto del gen producido por el vector de expresión con el producto natural. Si es posible, se debe disponer de un modelo animal que permita esta prueba *in vivo*. El estudio de los contaminantes debe estar enfocado hacia la presencia de pirógenos, trazas de proteínas, ADN y ARN celulares, contaminación microbiana y otros [13]

2.3 Características del pVAX1-LipL32

El gen LipL-32 fue clonado en el plásmido pVAX1 (Figura 2), con el cual se transformó *Escherichia coli DH5 α* . Está diseñado para atacar la enfermedad conocida como *leptospirosis*. El agente infeccioso de leptospirosis es una bacteria Gram negativa que pertenece al género *Leptospira*. Ésta bacteria es totalmente dependiente de oxígeno y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 29°C y 30°C a un pH de 7.2-7.6 [14].

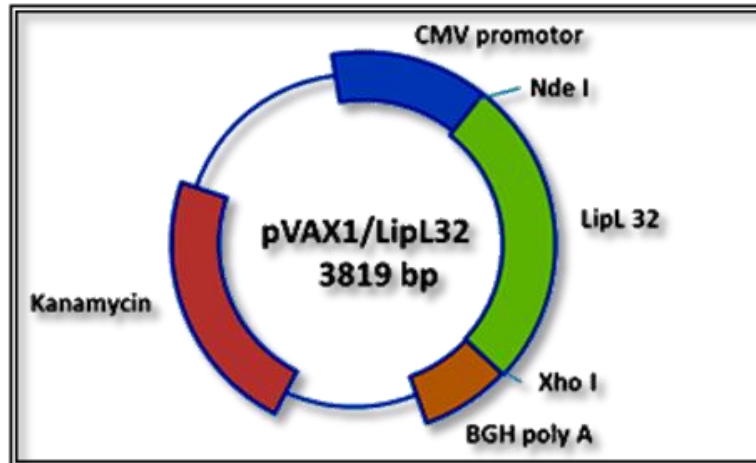


Figura 2. Representación esquemática del vector pVAX1-LipL32. El plásmido contiene una región promotor (CMV). El vector incluye las regiones que corresponden al gen de resistencia a antibióticos, en este ejemplo a la kanamicina y al origen de replicación en bacterias (Adaptado de Feng et al, 2009).

La leptospirosis es una enfermedad que afecta tanto a animales como al ser humano. Los mecanismos de infección son a través de la piel erosionada, mucosa ocular y nasal, al estar en contacto con agua, suelos húmedos y vegetación contaminada con orina, o por manipular fetos, placentas y vísceras de animales infectados. Las manifestaciones clínicas por lo general son temperatura elevada, cefalea, escalofríos, diaforesis, disnea de esfuerzo, derrame y hemorragia conjuntival, náuseas, vómito y diarrea.

2.4 Descripción del Proceso de Producción y Purificación de ADNp

El bioproceso para la producción de plásmido comprende todas las operaciones que requiere el caldo de cultivo para la obtención del producto en las condiciones de pureza y actividad deseadas. El proceso consta de cuatro pasos principales: Fermentación, Recuperación Primaria, Recuperación Intermedia y Purificación Final, los cuales se describen brevemente a continuación.

2.4.1 Fermentación

La fermentación de la bacteria hospedera puede realizarse en diferentes medios de cultivo, dependiendo del objetivo que se haya fijado. Generalmente, se emplean medios simples disponibles comercialmente como el Luria Broth (LB) y Terrific Broth (TB). El requerimiento de

pequeñas cantidades de plásmido purificado se puede realizar a escala laboratorio en cultivos en matraces agitados. Para mayor producción de cultivos celulares se utilizan biorreactores controlados (control de oxígeno disuelto y pH) en distintos modos de operación. La cuantificación de la concentración celular en un medio de cultivo es necesaria para la determinación de la cinética y estequiometría del crecimiento celular. Componentes intracelulares como el ARN, ADN y proteínas se pueden medir indirectamente con el crecimiento celular [16].

Fermentación por Lotes

La fermentación por lotes se conoce por su simplicidad. Todos los nutrientes para el crecimiento de la célula están presentes al momento de la inoculación. Durante un cultivo por lote, la concentración de estos componentes intracelulares cambia con el tiempo. Al graficar datos de concentración celular contra tiempo se forma la curva típica de crecimiento. Esta curva incluye una fase lag, fase de crecimiento exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Figura 3). La cinética puede describirse con la ecuación logística:

$$X(t) = \frac{X_0^* e^{\mu t}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu t})} \quad (1)$$

donde: $X(t)$ es la concentración celular (g peso seco celular/L), X_0 es la concentración inicial de la biomasa (g peso seco celular/L), X_∞ es la concentración de la biomasa cuando el tiempo tiende a infinito (g peso seco celular/ L) y μ es la velocidad específica de crecimiento [15].

Fermentación por Lote Alimentado

La fermentación por lote alimentado inicia con una fase por lotes. La alimentación controlada de sustrato empieza cuando las células han consumido la cantidad inicial de nutrientes. [16]. Las estrategias de alimentación pueden ser por control retroalimentado, basado en OD, pH, actividad metabólica de biomasa y concentración de sustrato. También por alimentación constante, lineal, escalonada, exponencial (Control predeterminado). En la Figura 3 se muestra una curva típica de crecimiento por lote y por lote alimentado.

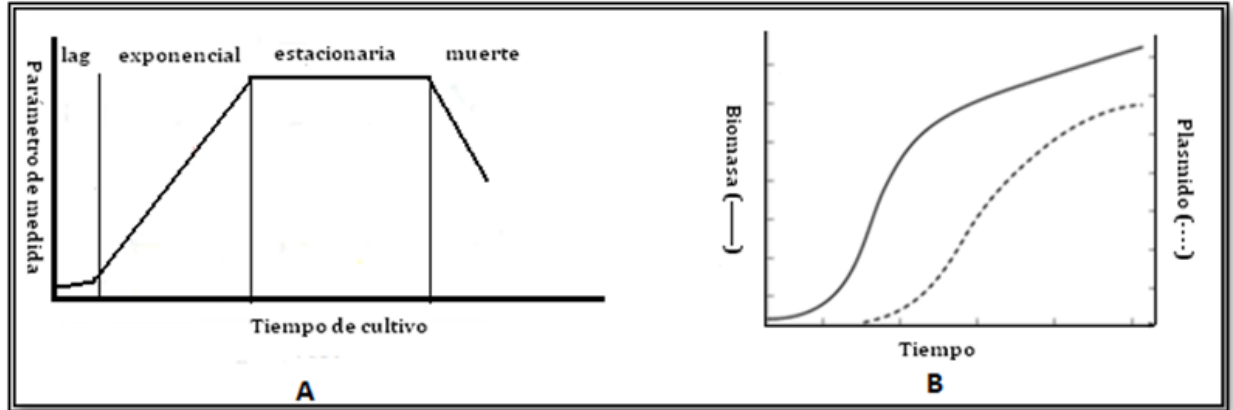


Figura 3. a) Curva típica de crecimiento de una Fermentación por lotes; b) Fermentación por lote alimentado.

2.4.2 Recuperación Primaria

Las células obtenidas del caldo después de la etapa de fermentación deben de pasar por un proceso de rompimiento celular para poder dejar libre el contenido celular. Esta etapa consta de las operaciones de cosecha celular y lisis. El método de rompimiento varía con el tipo de célula y naturaleza de los productos intracelulares. Los métodos de rompimiento celular pueden ser divididos en métodos mecánicos y métodos químicos [15].

Métodos de Rompimiento Celular

Métodos Mecánicos

- a) Molienda húmeda en molinos de perlas agitadas a alta velocidad. Las células son prensadas entre perlas de vidrio. Generalmente se utiliza en tratamiento de suspensiones celulares a gran escala [17].
- b) Homogenización a alta presión. Las células son forzadas a pasar a través de un pequeño orificio lo que produce que se rompan por el esfuerzo de corte. Se utiliza en tratamiento de suspensiones celulares a gran escala [15].
- c) Ultrasonificación. Este método utiliza un generador eléctrico para romper la pared celular. Éste generador produce ondas de ultrasonido y un transductor convierte las ondas en oscilaciones mecánicas. La densidad de onda es generalmente alrededor de 20

kc/s. Este método se utiliza para medios líquidos y no es recomendable para células muy sensibles [15].

- d) Homogenizador de cuchillos. las células son rotas en un mezclador. El esfuerzo cortante es moderado. Generalmente se utiliza para el rompimiento de tejidos y células animales [17].

Métodos Químicos

- a) Choque Osmótico. El rompimiento celular consiste en la carga de un volumen dado de células dentro de agua pura. La célula se expande debido a que contiene solutos que ocasionan un flujo osmótico del agua hacia su interior. Esta expansión puede conducir hacia su lisis o rompimiento. La factibilidad de este método depende de la resistencia mecánica de las células de interés. [15]
- b) Disolución lipídica. Se añade a la suspensión celular un volumen de tolueno igual al de 10% de la biomasa. El tolueno es absorbido dentro de los lípidos de la pared celular, lo que produce la expansión de la pared y la ruptura de esta. El contenido es liberado y entonces puede ser separado el producto de interés.
- c) Digestión Enzimática. Consiste en el empleo de enzimas que atacan la pared celular y provocan el rompimiento celular. Una de las enzimas más utilizadas en la digestión enzimática de bacterias es la lisozima. [17].
- d) Tratamiento Alcalino. Se basa en la solubilización de membranas por saponificación de lípidos pequeños. Un método utilizado comúnmente es el rompimiento celular con hidróxido de sodio, (NaOH) y dodecilsulfato de sodio (SDC) a un pH controlado. Esto permite la desnaturalización selectiva de ADN cromosómico mientras que el ADN superenrollado mantiene su estructura de doble cadena [18].

Aunque se pueden utilizar varias técnicas en la ruptura de las células de *E. coli* para liberar las moléculas de ADNp, el daño es generalmente significativo [19,20]. El método más ampliamente usado es la lisis alcalina, originalmente descrito por Birnboim y Doly, 1979.

2.4.3. Recuperación Intermedia

El objetivo de la etapa de recuperación intermedia es actuar sobre el lisado clarificado de las células de *E. coli* para concentrar el ADN plasmídico y reducir la mayor cantidad posible de impurezas o contaminantes (ARN, proteínas), las cuales están presentes en un 90% de la masa total del soluto [21]. Existen varias técnicas que se utilizan para la recuperación intermedia del plásmido. A continuación se describe brevemente cada una de ellas.

Precipitación (PP): Es un método muy popular que se utiliza para concentrar ADN plasmídico por medio de agentes químicos como el isopropanol, polietilenglicol (PEG). Tiene como ventajas la remoción de ácidos nucleicos de bajo peso molecular, separación de las isoformas del plásmido lineal y superenrollado, remoción de gran cantidad de impurezas como proteínas, endotoxinas y ARN utilizando sulfato de amonio, acetato de amonio y cloruro de calcio. La desventaja de esta técnica es que tiene limitaciones de escalamiento y un costo elevado de instalación. [22]

Sistema de Extracción en dos Fases Acuosa (ATPS): Es una alternativa para la recuperación intermedia del plásmido. Se utiliza PEG el cual se acumula en la fase superior y un segundo polímero o sal se enriquece en la fase inferior del sistema. En ambos casos las moléculas de plásmido se trasladan a la fase enriquecida de sal (parte inferior), mientras que la mayoría de las impurezas se mueven a la fase superior enriquecida de PEG 600. Se logra remover el 98% de ARN y proteínas, el 68% de endotoxinas. Tiene ventaja esta técnica si se quiere pasar la solución por una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica ya que el plásmido fue recuperado en una fase enriquecida de sal. [23]

Sistema Combinado de ATPS y Membranas: Es una técnica propuesta para la separación y purificación del plásmido sin necesidad de utilizar una columna de cromatografía como etapa final. Es un sistema de dos fases PEG 800/solución salina. El plásmido se recupera en la fase inferior enriquecida de sal y pasa por una segunda extracción para remover las impurezas e isoformas circular abierto restantes. En estudios realizados se obtuvo un rendimiento de plásmido de 95% (3% plásmido circular abierto) en un proceso de escala piloto [21].

Ultrafiltración con Flujo Tangencial (TFF): Es una técnica de separación que se caracteriza por una circulación rápida del líquido a filtrar en dirección tangencial a la membrana. Toma ventaja en el tamaño grande de la molécula de plásmido ($3.3 - 13.2 \times 10^3$ kDa), permitiendo concentrar y eliminar moléculas más pequeñas y permeables (sales, proteínas, endotoxinas, ARN pequeño). Se utilizan membranas porosas de diferente material y tamaño de poro. Se agrega una solución de lavado que permite que la membrana se esté limpiando constantemente. En general, la recuperación del plásmido es alta (80-100%) si se ha realizado un pre tratamiento a la solución de lisado [10, 17].

2.4.4 Purificación Final

Como procedimiento de purificación de plásmido, la cromatografía es la operación más utilizada. Diferentes métodos de cromatografía incluyendo, exclusión por tamaño, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y afinidad se han integrado en el proceso de purificación de plásmido.

Las formas de operar una columna de cromatografía son: por elución y frontal. La cromatografía por elución es un método para separar en sus componentes (resolver) una mezcla de solutos y es empleada con el propósito de purificar productos de interés. Esta se efectúa en columnas empacadas con adsorbentes que pueden ser sólidos, sólidos porosos o geles. El adsorbente constituye la fase estacionaria de la columna.

En esta operación se aplica a la columna empacada una pequeña cantidad de muestra en la parte superior. Una vez colocada la mezcla se hace pasar un líquido que favorezca la desorción llamado eluyente (fase móvil). Conforme avanzan los solutos sobre la columna estos se separan permitiendo su purificación.

En la cromatografía por elución isocrática la composición de eluyente se mantiene constante durante el proceso. En la elución por gradiente la composición del eluyente se varía gradualmente.

La operación de una columna de cromatografía es similar a la de una columna de adsorción. Sin embargo, en la cromatografía por elución la columna no se satura completamente con soluto, sino que solo se carga en forma controlada una porción de ésta.

La decisión entre emplear adsorción frontal o cromatografía por elución en una separación, radica principalmente en la dilución del soluto. En la cromatografía por elución el soluto se purifica a expensas de cierto grado de dilución, mientras que en la adsorción el soluto se retiene en la columna y posteriormente se eluye concentrado. [17]

Fundamentos

Existen varias técnicas cromatográficas basadas en la interacción de una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Cinco aspectos fundamentales permiten distinguir las semejanzas y diferencias entre ellas:

- 1.- El tipo de principio de separación que emplea cada una de ellas.
- 2.- Las características de las matrices que utilizan.
- 3.- La presión a la que se desarrollan.
- 4.-La relación de equilibrio.
- 5.- La cinética de la adsorción.

Tipos de cromatografía Líquida según el Principio de Separación

De acuerdo al principio utilizado para la separación se pueden distinguir tres tipos básicos de cromatografía por elución:

- 1.- Cromatografía Líquido-Líquido: En la cromatografía líquido-líquido se utiliza un adsorbente sólido impregnado con un líquido que funciona como fase estacionaria. La separación de los solutos es resultado de las diferencias en los coeficientes de participación de cada uno de los solutos de la mezcla entre las fases líquidas (estacionaria y móvil).
- 2.- Cromatografía por Filtración en Gel.-La cromatografía por filtración en gel utiliza partículas fabricadas de geles porosas que actúan como mallas moleculares que permiten separar

moléculas en función de su tamaño. Este tipo de cromatografía es comúnmente empleada en las últimas etapas de los procesos de obtención de biomoléculas.

3.-Cromatografía por Adsorción.- La cromatografía por adsorción emplea adsorbentes en los que los solutos a separar presentan diferentes grados de retención. Existen varias modalidades caracterizadas básicamente por el tipo de adsorbente que emplea, llamadas cromatografía de adsorción:

- Física.
- Por intercambio iónico.
- De interacción hidrofóbica.
- De fase inversa.
- De afinidad.

Tabla 3.Principios de separación en cromatografía por adsorción [11].

| Propiedad | Técnica |
|-------------------|---|
| Carga | Cromatografía de Intercambio Iónico |
| Tamaño | Filtración en gel también llamada exclusión |
| Hidrofobicidad | Cromatografía de interacción hidrofobia |
| Bioreconocimiento | Cromatografía de afinidad |

En la Figura 4 se muestra la representación gráfica de los mecanismos de operación de las cromatografías por adsorción.

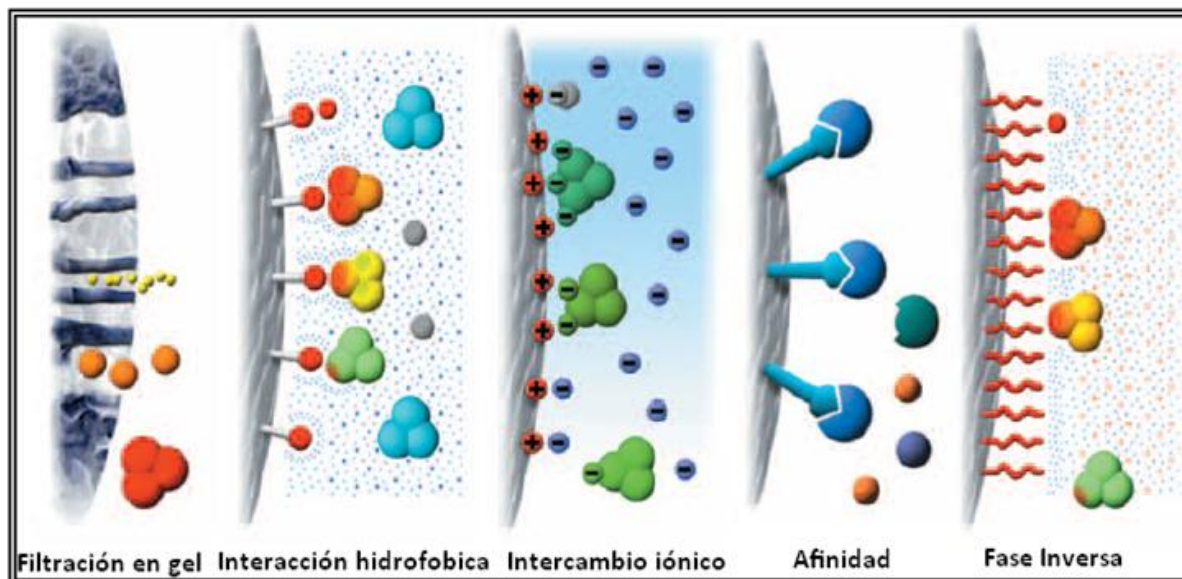


Figura 4. Esquema representativo de la separación en los distintos métodos de cromatografía por adsorción

Cromatografía por adsorción física o adsorción simple.- Se caracteriza por la unión del soluto al adsorbente por fuerzas débiles del tipo de Van Der Waals. Este tipo de cromatografía es poco selectiva entonces se utiliza poco a nivel analítico, pero por su bajo costo es utilizada a nivel industrial.

Cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de fase inversa.- Tanto la cromatografía de interacción hidrofóbica como la de fase inversa, se basan en la interacción entre las regiones hidrofóbicas de moléculas como las proteínas y los grupos hidrofóbicos de los adsorbentes empleados.

Cromatografía por afinidad.-La cromatografía por afinidad está basada en interacciones altamente específicas entre el soluto de interés y el adsorbente. Este tipo de cromatografía es muy empleada en la purificación de proteínas. Los adsorbentes utilizados en esta cromatografía presentan grupos químicos llamados ligandos que son altamente específicos para la unión con los solutos.

Cromatografía por intercambio iónico.-La cromatografía por intercambio iónico se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados de los adsorbentes utilizados en ésta. La cromatografía de intercambio iónico para la separación de biomoléculas se introdujo en la década de 1960 y continúa jugando un papel importante tanto

en la separación como en la purificación de las mismas. Hoy en día, la cromatografía de intercambio iónico es una de las técnicas más utilizadas para la purificación de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas, ofrece una alta resolución y separaciones de grupo con alta capacidad de carga. Estas características hacen que la cromatografía de intercambio iónico sea muy adecuada para la captura, la purificación intermedia o etapa de acabado en un protocolo de purificación.

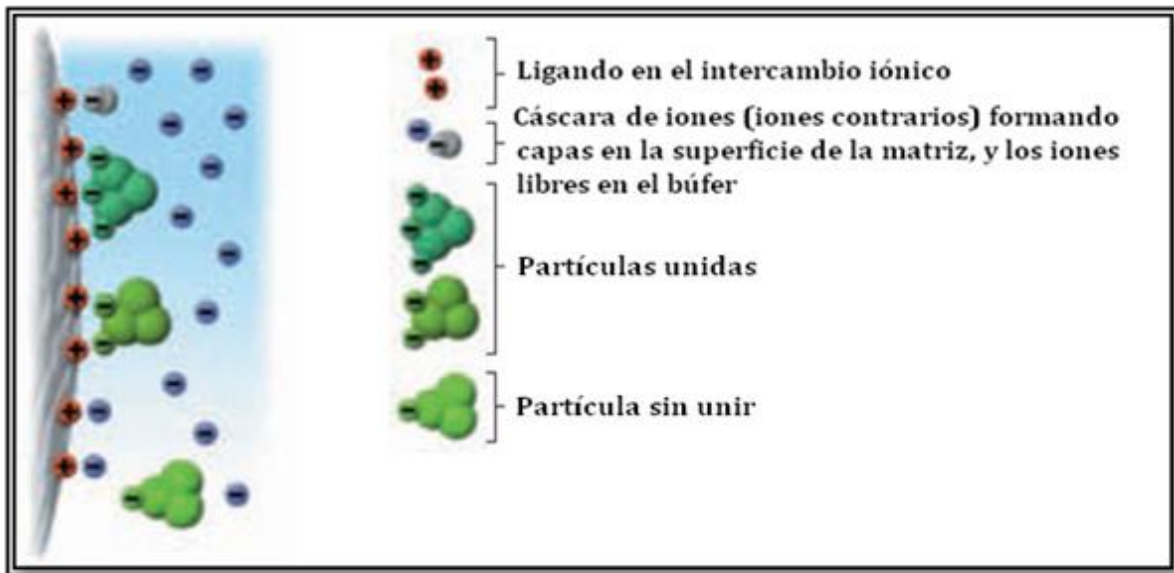


Figura 5.Principios de Separación en Cromatografía de Intercambio Iónico

Etapas de la cromatografía por intercambio iónico

En la Figura 6 se muestra la etapa de equilibrio, donde la fase estacionaria de la columna de cromatografía de intercambio iónico se equilibra con buffer de baja fuerza iónica.

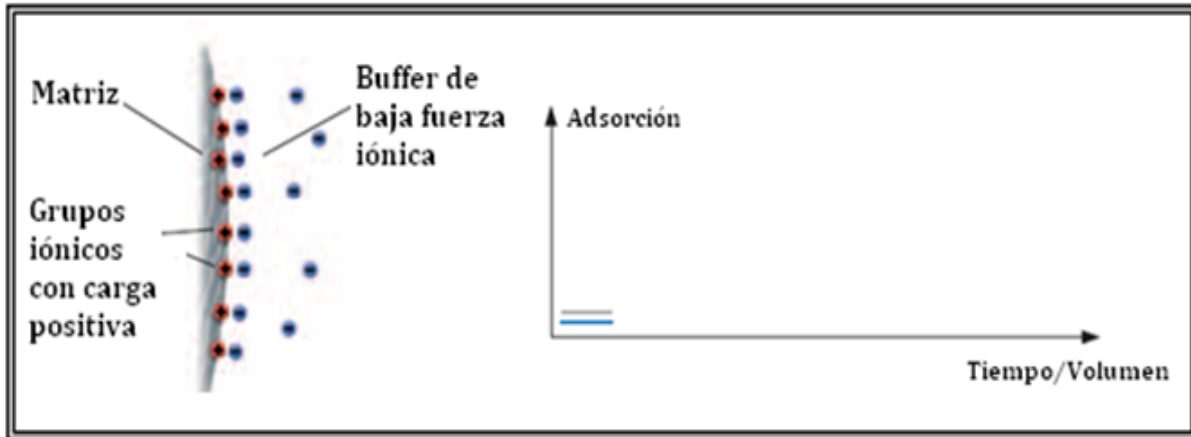


Figura 6. Etapa 1, equilibrio en la columna empacada.

En la etapa de adsorción (Figura 7), las partículas con carga opuesta a los grupos iónicos del medio, son concentradas en la columna, mientras que las partículas sin carga, o las que tienen la misma carga que los grupos iónicos, se eluyen poco después de la aplicación de la muestra.

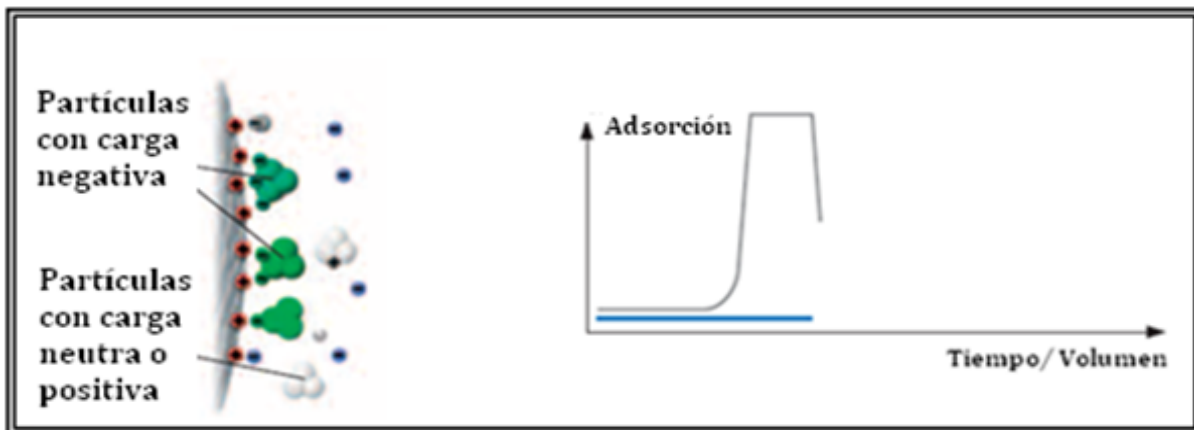


Figura 7. Etapa 2, aplicación de la muestra a la columna.

En las Figuras 8, 9 y 10 se observa la etapa de elución. En esta etapa se alimenta un buffer para incrementar la fuerza iónica (usando gradiente), de esta forma se desplazan las partículas iónicamente unidas, y los iones contenidos en el buffer compiten por los sitios de unión.

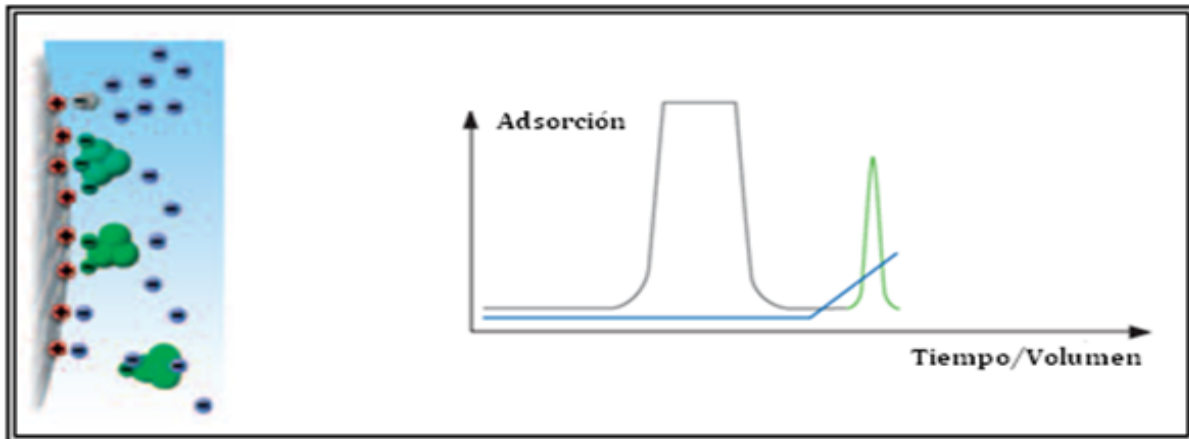


Figura 8. Etapa 3, primera elución

Un incremento en la fuerza iónica desplaza a las partículas que están más fuertemente unidas.

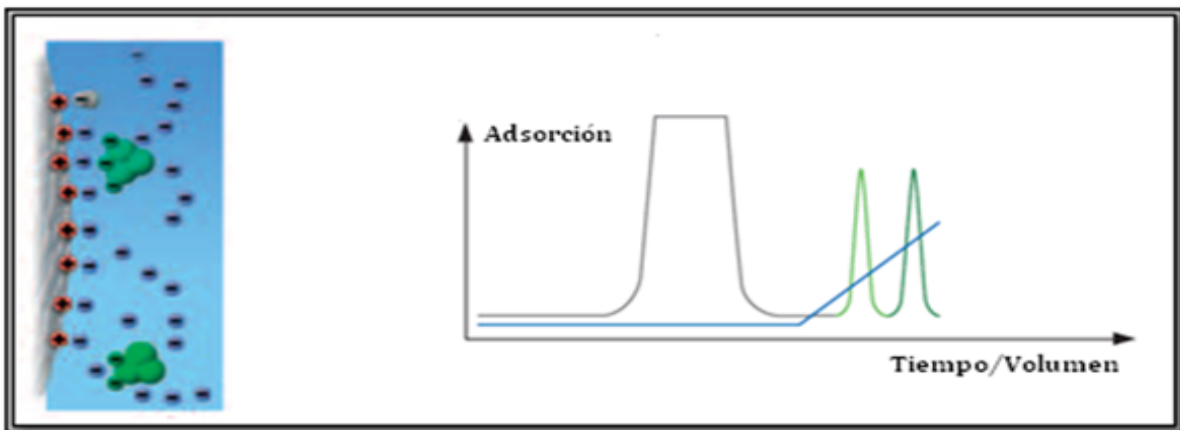


Figura 9. Etapa 3, segunda elución

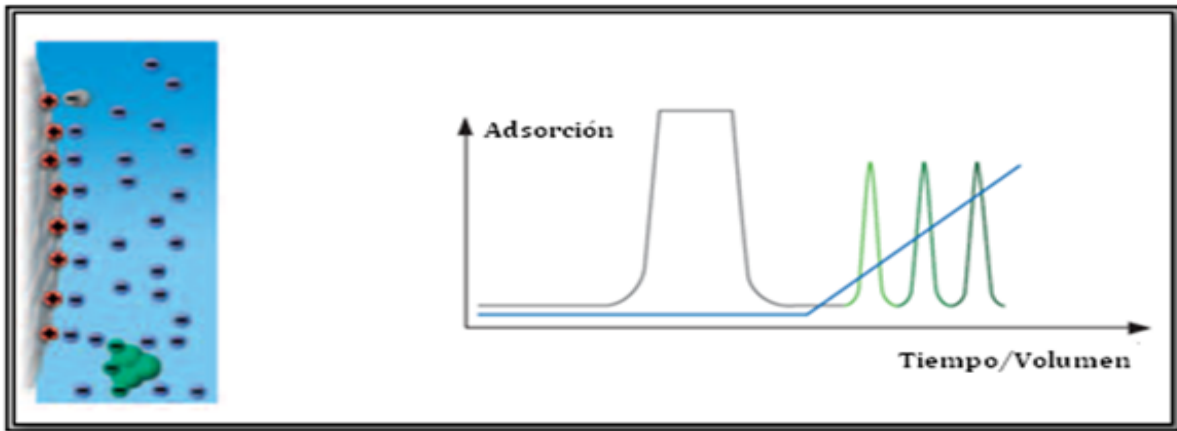


Figura 10. Etapa 3, tercera elución

Finalmente un incremento mayor en la fuerza iónica, por el gradiente, elimina cualquier partícula iónicamente unida antes del re-equilibrio.

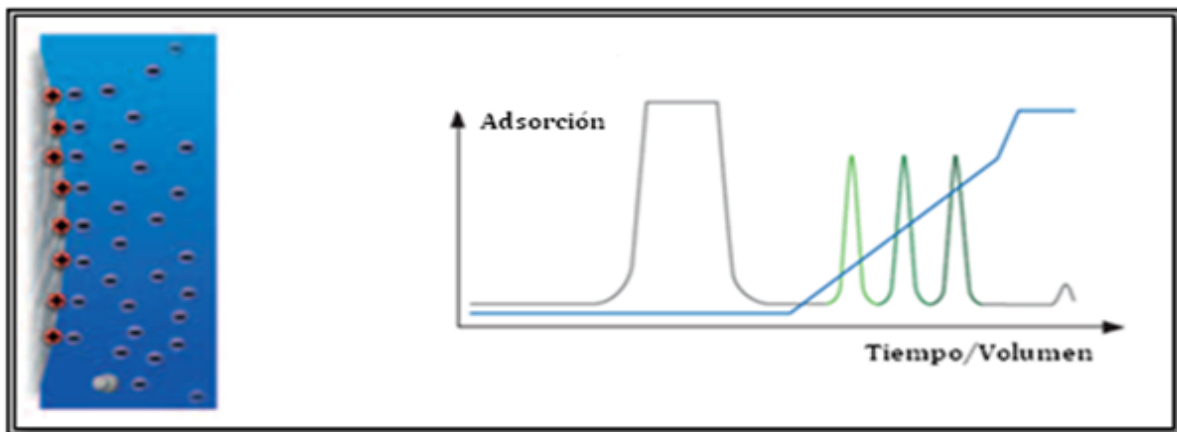


Figura 11. Etapa 4, lavado de la columna.

De esta manera, después de la adsorción se usa un gradiente de sal para desplazar los diferentes ácidos nucleicos, los cuales eluyen incrementando la carga neta, en función de la longitud de la cadena y conformación [9, 24]. La forma y tamaño de las moléculas juegan un papel importante, ya que en algunas matrices de intercambio iónico, la forma más compacta súperenrollada, que tiene una alta densidad de carga, eluye después que la forma circular abierta, la cual tiene menor densidad de carga total [11, 25].

Los plásmidos son moléculas muy grandes ($PM > 3 \times 10^6$, diámetro hidrodinámico de 200 nm) que no pueden penetrar en los poros de la mayoría de las matrices cromatográficas de

intercambio iónico comerciales (partículas de diámetro de poro < 200 nm), originalmente diseñadas para la separación de proteínas. Esto significa que sólo la superficie externa y una capa delgada están disponibles para adsorber, por lo que el fenómeno sólo ocurre en la superficie [9, 26]. Esto representa una limitación en el proceso cromatográfico con partículas de intercambio iónico, que presentan únicamente poros difusivos (Fig. 12) [25, 27]. En investigaciones realizadas por Teeters [28] se reportan capacidades de membranas perfusivas de un orden de magnitud mayor que las capacidades típicas reportadas para plásmidos en partículas porosas. La cromatografía de membranas basada en el uso de poros perfusivos (poros de 800 a 1000 nm), permite el flujo convectivo del soluto al sitio de adsorción, en consecuencia disminuye el tiempo de residencia en la columna y se obtiene una mayor productividad en los procesos (Figura 12) [26, 28 – 30]. La cromatografía de intercambio iónico se ha utilizado para capturar ADNp de lisado crudo o de soluciones conteniendo ADNp obtenido después de la pre-purificación en operaciones como TFF, ATPS o HIC [10].

La cromatografía de interacción hidrofóbica, generalmente, se aplica como una operación de remoción de impurezas, aprovechando el hecho de que las mayores impurezas como el ARN y gDNA son más hidrofóbicas que el ADNp [31]. La HIC se beneficia de la alta hidrofobicidad de las cadenas sencillas de los ácidos nucleicos que muestran una alta exposición de las bases aromáticas comparada con los ácidos nucleicos de doble cadena. Las moléculas de plásmido de doble cadena tienen las bases hidrofóbicas empacadas dentro de la hélice, por lo que la interacción con el soporte hidrofóbico es mínimo [32]. Dado que las soluciones alimentadas a una columna de interacción hidrofóbica deben acondicionarse con alta concentración de sal, este tipo de cromatografía es especialmente conveniente si se aplica después de las etapas de precipitación con sulfato de amonio [31].

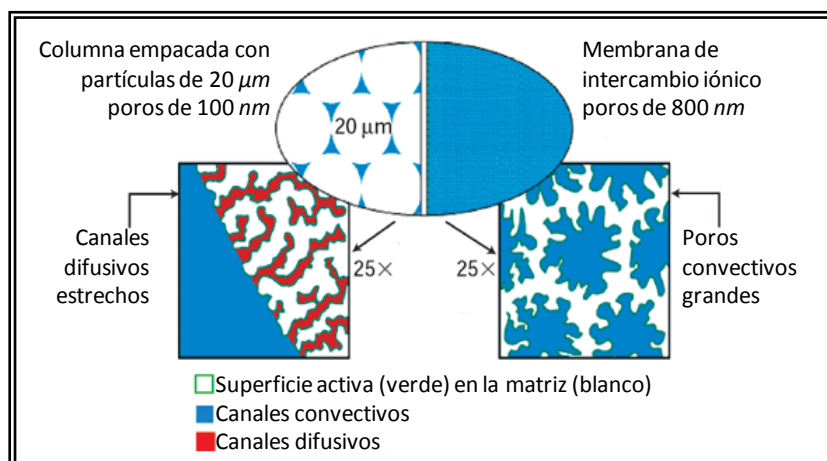


Figura 12. Comparación de los sitios de adsorción en las partículas y membranas de intercambio iónico.

La cromatografía de afinidad se basa en el reconocimiento de una estructura particular en la molécula de plásmido por un ligando inmovilizado a una matriz disponible basada en la formación de la hélice triple o interacción proteína-DNA. La formación de hélice triple entre un oligonucleótido inmovilizado a una secuencia específica insertada en el plásmido, se ha reportado como un método altamente específico, sin embargo está limitada por la formación lenta del enlace [25]. En estudios más recientes, se investiga la interacción del ADNp con una matriz de agarosa-histidina basada en interacción hidrofóbica y de pseudo-afinidad, como una estrategia para capturar específicamente ADNp-SC de lisados de *E. coli* parcialmente purificados [33].

2.4.5 Electroforesis Convencional

La electroforesis convencional ha sido utilizada durante muchos años para separar especies complejas de elevado peso molecular de interés biológico y bioquímico. Las separaciones se llevan a cabo sobre una capa delgada y plana o placa de un gel semisólido y poroso que contiene un tampón acuoso en el interior de sus poros. Esta será la sustancia encargada de ofrecer resistencia al movimiento de las moléculas, controlando de manera uniforme su migración.

Mediante esta técnica se pueden separar varias muestras simultáneamente. Dichas muestras se depositan sobre el gel, se aplica un potencial de corriente continua a través del mismo durante un tiempo fijo. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las especies separadas se tiñen para visualizarse.

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de ADN y RNA. Los geles que se emplean son geles tridimensionales de polímeros ramificados que tienen los espacios entre ramificación rellenos de líquido. Las redes de polímeros no solo reprimen la convección sino que también actúan como cribas que pueden retardar y hasta bloquear la migración de los analitos poliméricos más grandes. En cambio los iones pequeños pueden moverse libremente a través de la estructura porosa del gel. De este modo la electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación: electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y tamizado, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de Biología Molecular. La poliacrilamida es un polímero formado a partir de acrilamida y N,N' metilenbisacrilamida. La concentración de ambos reactivos define el grado de reticulación del gel.

Ambos geles tienen en común que adquieren la misma forma y están prácticamente libres de cargas iónicas. Esto es importante para evitar que la disolución tampón se desplace por el gel cuando se active el campo eléctrico. Existen otros tipos de electroforesis en gel como son la electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa, electroforesis en campo pulsado y la electroforesis preparativa. Estas técnicas no son de aplicación tan general pero no por ello dejan de ser importantes [34].

2.4.6 Espectrofotometría

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia, mediciones de absorbancia hechas en un espectrofotómetro Thermo ScientificNanoDrop incluye la absorción de todas las moléculas de la muestra a la longitud de onda de interés. Dado que los nucleótidos, ARN y ADN de cadena simple se absorben a 260 nm todos contribuirán a la absorción total de la muestra, por lo tanto para asegurar resultados precisos cuando se utiliza un espectrofotómetro, las muestras de ácidos nucleicos requieren una purificación previa a la medición. La relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) se espera sea dentro de 1.7 a 1.9 para indicar pADN purificado. Una proporción de 1.8 para de pADN es generalmente aceptado como "puro", mientras que una proporción de 2.0 es generalmente aceptado como "puro" para ARN. Si la proporción es sensiblemente menor en cualquiera de los casos, puede indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben fuertemente en o cerca de 280 nm [35,36].

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Durante la investigación se utilizó como macromolécula modelo el plásmido pVAX1 con el gen insertado LipL-32. Es una molécula con peso molecular aproximadamente de 4000 pares de bases. En la producción de plásmidos se utilizaron cepas de *Escherichia Coli* (*E.Coli*) con el plásmido pVAX1- LipL32 hospedado.

En la fermentación en matraz se utilizó el medio de cultivo Luria Broth y Kanamicina para prevenir el crecimiento de otra cepa y dar resistencia a las células

Para la recuperación primaria se prepararon las siguientes soluciones: Solución de resuspensión, llamada solución P1, compuesta por 50 mM glucosa, Tris- HCl 25 mM (Hidroximetil Amino Metano, P.M.=121.14), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM (PM 292.25); solución de lisis, llamada solución P2, conteniendo NaOH 0.2M, SDS 1% (m/v) y solución de neutralización, llamada solución P3, compuesta por Acetato de Potasio 3M en Ácido Acético Glacial y agua desionizada. Estas soluciones fueron pasadas a través de un microfiltro, Millipore 0.45 μm .

En la recuperación intermedia y en la concentración se utilizaron membranas de fibra hueca de polisulfona (cartuchos) con tamaño de corte de 500 kDa y 300 kDa respectivamente. El Buffer de lavado que se utilizó en los experimentos fue 10 mM Tris y 1.0 mM EDTA (PM 292.25) a pH 8.0 (Buffer TE). Para realizar la limpieza de los cartuchos de ultrafiltración, después de cada experimento se realizó un lavado con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 100 ppm, seguido de otro lavado con hidróxido de sodio 0.1N y finalmente para guardar la membrana se utiliza etanol al 30%. Las membranas se acondicionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. En los estudios electroforéticos se utilizó agarosa 0.8% en buffer 1X, Tris-Acetato-EDTA (buffer TAE) el marcador Supercoiled DNA Ladder, Invitrogen. La solución para teñir el gel fue bromuro de etidio 1X (Ver Anexos A y B).

El empaque de las columnas de cromatografía fue realizado con membranas de intercambio iónico mustang Q marca Pall (ver anexo C) previamente acondicionadas según las especificaciones del fabricante.



Figura 13.Membrana Mustang Q coin en el empaque del fabricante

3.2. Equipo

En los cultivos en matraz se utilizó una incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR (Figura 14). Para el control del crecimiento celular se midió la absorbancia del cultivo a una longitud de una de 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer.

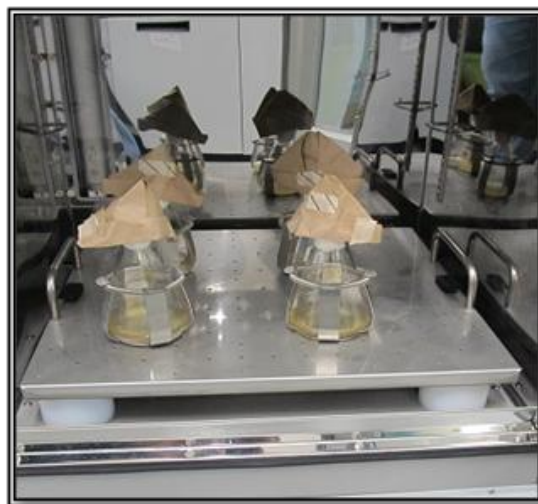


Figura 14. Incubadora, Orbital Shaker Incubator, VWR.

En la etapa de recuperación primaria se utilizó una centrifuga Allegra X-22, Beckmam Coulter (Figura 15). En la clarificación se pasó a vacío por un filtro Millipore de 0.45 μm .



Figura 15.Centrífuga Allegra X-22, Beckmam Coulter.

El equipo usado para llevar a cabo la etapa de pre-purificación así como la concentración del ADN plasmídico tanto en la primera como en la segunda etapa de la purificación consistió en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE Healthcare acoplado a un equipo BioRad Biological LP Chromatography con monitor de computadora para medir absorbancia y conductividad durante el experimento (Figura 16). El software donde se registraron los datos fue LPData View acoplado al equipo Biologic Bio-Rad. Los cartuchos contienen dos membranas de fibra hueca de polisulfona (1 mm de diámetro interno, 30 cm de longitud con un área total de filtración de 16 cm^2). La longitud de las tuberías se redujo lo más posible y la calibración del flujo volumétrico de alimentación se verificó antes de todos los experimentos.



Figura 16. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE.

Durante la etapa de purificación se manejó una columna con diámetro interior de 0.5 cm marca Pharmacia Biotech de flujo frontal (Figura 17) adaptada al cromatografo BioRad BioLogic HR en conjunto con el colector de fracciones BioRad modelo 2128 todo acoplado a un sistema de cómputo por medio del software BioLogic HR (Figura 18).



Figura 17. Columna Pharmacia Biotech

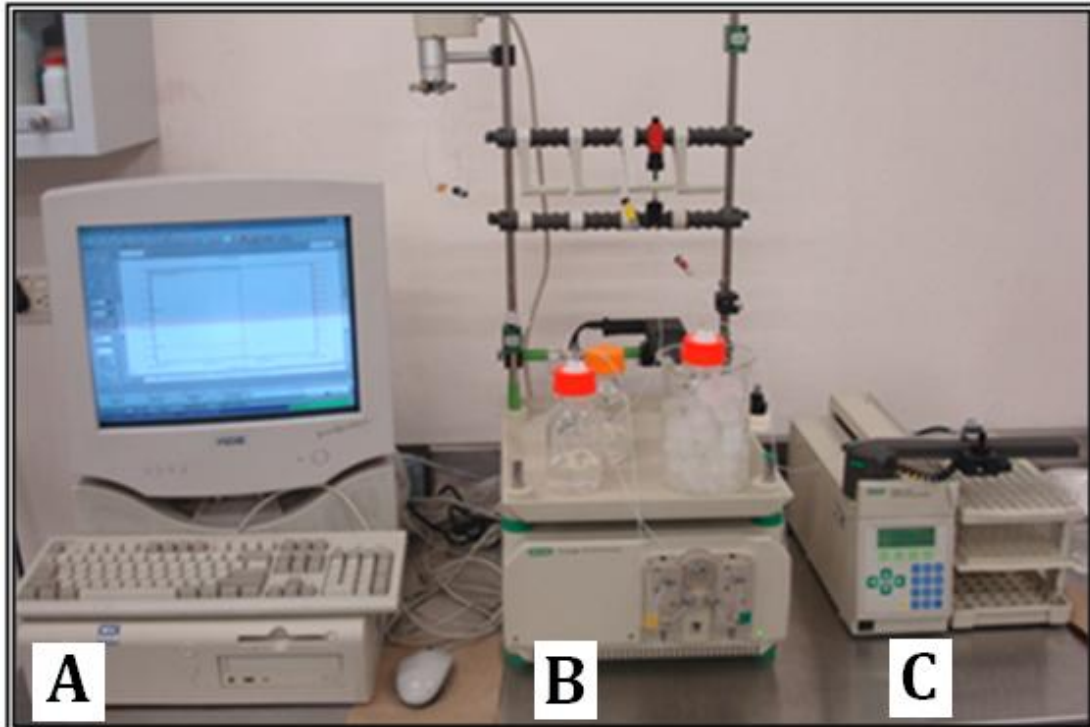


Figura 18. A: Sistema de computo con el software BioLogic HR; B: Cromatografo BioRad BioLogic HR; C: Colector de fracciones BioRad modelo 2128

En los estudios electroforéticos se utilizó una cámara horizontal de electroforesis GT mini gel casting system de Biorad (Figura 19) y para la fotografía del gel de agarosa se utilizó el equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad (Figura 20).

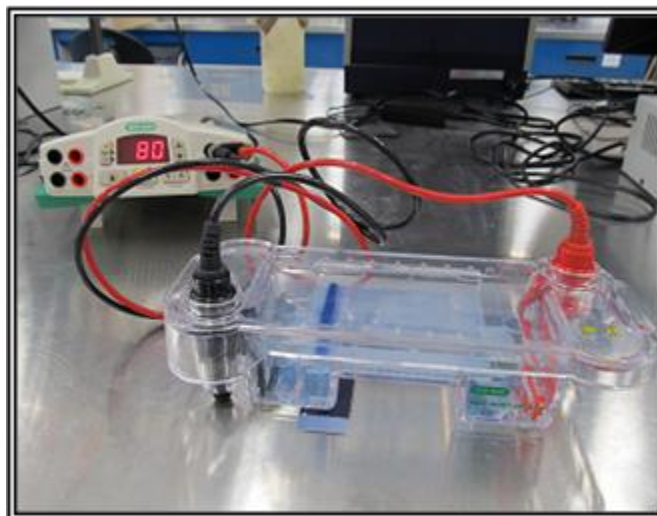


Figura 19. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.



Figura 20. EquipoMulti –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad

En los estudios de espectrofotometría se utilizó el espectrofotómetro Uv-Vis NanoDrop ND-1000 que permite análisis altamente precisos de muestras de ácidos nucleicos (ADN, RNA), marcadores de ácidos nucleicos, proteínas, marcadores de proteínas y cultivos celulares. Este sistema elimina la necesidad de utilizar cubetas y capilares, disminuyendo el tiempo de obtención de resultados de las muestras. Su alta capacidad de absorbancia, así como su alta reproducibilidad, elimina la necesidad de diluir en la mayoría de los casos [34]. Este equipo fue adaptado a un sistema de cómputo y operado por medio del software ND-1000 V3.7.1

3.3 Metodología

Durante la investigación se trabajó con cultivos por lotes en matraz de cepas bacterianas que contenían el plásmido de interés pVAX1-LipL32. En la Figura 21, se presentan las etapas utilizadas en el proceso de producción, pre-purificación y purificación final de plásmidos a partir de la cepa hospedera.

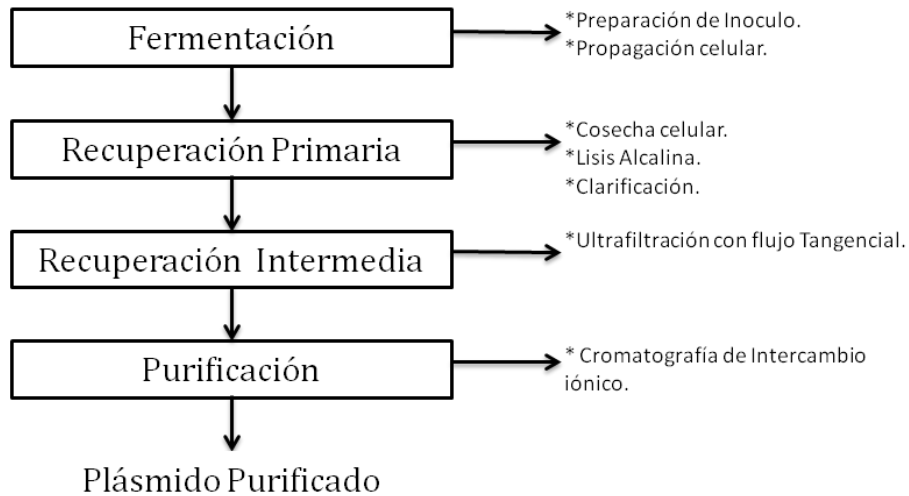


Figura 21. Proceso de purificación de plásmidos a partir de la cepa hospedera.

3.3.1 Fermentación

La producción de plásmido para esta investigación se realizó utilizando la cepa *E. coli* DH5 α con el plásmido pVAX1- LipL32. Se utilizó el medio Luria Broth en la fermentación en matraz y Kanamicina para dar resistencia a las células.

Crecimiento de inóculo en matraz. Se realizaron fermentaciones en matraz a una temperatura de 37°C y a 250 rpm durante 12 horas. El inóculo se preparó con 30 mL de medio de cultivo LB de concentración 20 g/L en matraces de 100 mL. Al medio estéril se añadieron 30 μ L de una solución de Kanamicina de 30 mg/mL de concentración, previamente filtrada. El medio fue inoculado utilizando un tubo eppendorf con 100 μ L (80 μ L de cultivo + 20 μ L de glicerol, congelado a -40°C) de *E. coli* DH5 α conteniendo pVAX1-LipL32. El cultivo se realizó en la incubadora a temperatura de 37 °C y agitación de 250 rpm, de 8 a 10 h, hasta alcanzar una densidad óptica, de aproximadamente 1.2 ($DO_{600} \approx 1.2$), a 600 nm.

Propagación celular en matraz. La obtención de la biomasa se realizó mediante cultivos en matraces de 2 L con 220 mL de medio LB estéril (20 g/L). Se añadió los 30 mL de inóculo y 250 μ L de Kanamicina de 30 mg/mL, previamente filtrada. El cultivo se desarrolló en una incubadora a 37 °C y 250 rpm, por un período aproximado de 12 h, hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 3.8$.

3.3.2 Recuperación Primaria

Al finalizar el cultivo, las células fueron cosechadas por medio de centrifugación a 3500 g, 4°C por 20 minutos. Se recolectó el sólido (biomasa) y se desechó el sobrenadante. Se determinó el peso de las células húmedas.

A la biomasa se le agregaron 8 mL de la solución P1 por gramo de células húmedas y se agitó hasta resuspender el paquete celular. Inmediatamente se agregó un volumen igual de la solución P2 para realizar la lisis celular y se agitó suavemente y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. En último lugar, se neutralizó agregando un volumen igual de la solución P3 a una temperatura aproximada de 4°C, se agitó suavemente y se incubó por 10 minutos en hielo.

El lisado conteniendo el plásmido se clarificó mediante la extracción del precipitado formado durante la etapa de lisis (restos celulares, ADN genómico y proteínas) por centrifugación a 12000 g por 30 min a 4°C en dos pasos. (Se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones). El lisado clarificado se filtró a vacío con un filtro de 0.45 μ m para asegurar la remoción completa de partículas suspendidas.

3.3.3 Recuperación Intermedia

La recuperación intermedia del plásmido se realizó en un sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System, GE Healthcare) utilizando una membrana de fibra hueca de polisulfona con tamaño de corte de 500 kDa.

Se manejó el sistema a un flujo de alimentación de 50 mL/min. La membrana, en el cartucho de ultrafiltración, fue acondicionada de acuerdo al procedimiento establecido por el fabricante.

Antes de empezar se introdujo al sistema el buffer TE por 10 minutos para lograr humedecer y homogenizar todas las áreas del sistema.

La recuperación de los plásmidos se inició introduciendo una solución de lisado clarificado a la membrana con el flujo establecido. Al tanque de alimentación se agregó constantemente una solución de buffer TE con el mismo flujo de filtrado, para lavar la solución de retenido.

3.3.4 Purificación

En la figura 22 se presenta el procedimiento que se siguió con el ADNp durante la etapa de purificación.

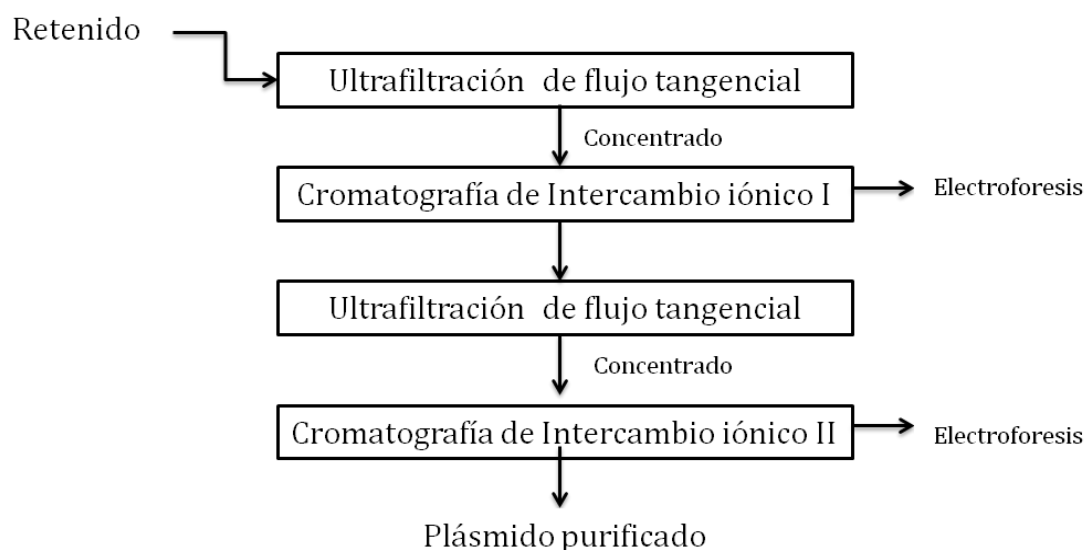


Figura 22. Diagrama de flujo de la etapa de purificación del ADNp

Con el fin de concentrar la solución de retenido derivado de la etapa de pre-purificación con membrana de 500 kDa, se procesó nuevamente en el sistema de ultrafiltración con flujo tangencial MidJet Benchtop System, GE Healthcare utilizando ahora una membrana de fibra hueca de polisulfona con tamaño de corte de 300 kDa. Manejando el sistema a un flujo de alimentación de 50 mL/min, en esta ocasión sin alimentación de buffer TE, con el objetivo de concentrar la cantidad de ADNp en el volumen final.

Durante el desarrollo de la purificación por cromatografía frontal, se utilizaron membranas de intercambio iónico Mustang Q coin marca Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro

nominal de 800 nm así como soportes de polipropileno. Las membranas y los soportes fueron reutilizados acondicionándose después de cada corrida experimental según las especificaciones del fabricante. Tanto las membranas Mustang Q coin como los soportes se cortaron a un diámetro de 0.5 cm utilizando un sacabocados de acero inoxidable (Ver Figura 23).

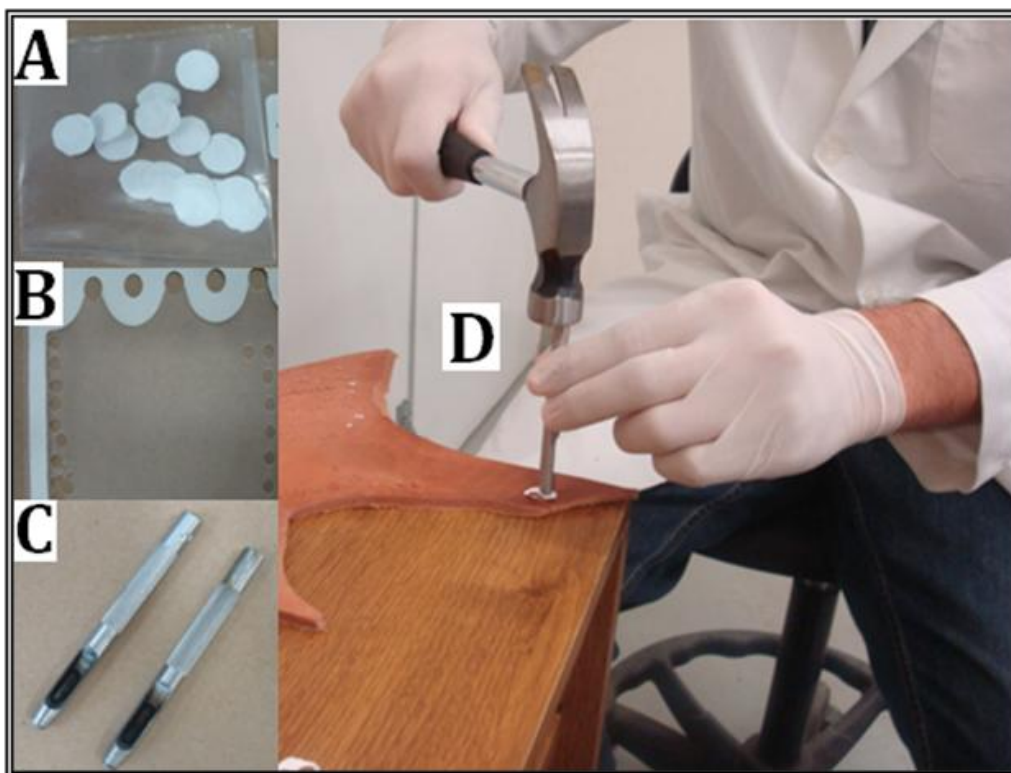


Figura 23. A: Membranas Mustang Q Coins desempacadas; B: Soporte de polipropileno; C: Sacabocados de 0.5 cm de diámetro; D: Corte de membranas por medio del sacabocados.

Posteriormente se sumergieron en 1.0 M NaOH por 5 min, agitando suavemente. Al terminar el tiempo se retiró el NaOH y se enjuagaron con 1.0 M NaCl por 5 min, con agitado suave. Al final de este tiempo se retiró la solución de NaCl y se enjuagaron dos veces con buffer TE. Por último, las membranas y los soportes se dejaron reposar por aproximadamente 12 horas en el mismo buffer, para que se equilibraran previamente a su uso. (ver anexo A).

Una vez que se acondicionaron las membranas y los soportes se procedió a empacar la columna y posteriormente a la colocación de la columna ya empacada en la parte superior del cromatografo BioRad BioLogic HR como se muestra en la Figura 24.

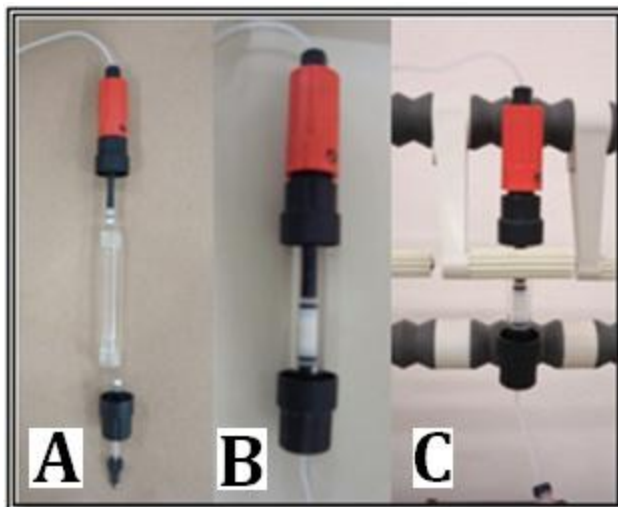


Figura 24. A: Columna Pharmacia Biotech B: Columna empacada con las membranas mustang Q y los soportes de polipropileno; C: Columna empacada acoplada al cromatografo BioRad BioLogic HR

Antes de iniciar las conexiones del cromatografo con la columna, las bombas fueron calibradas por medio del software BioLogic HR, posteriormente se procedió a hacer todas las conexiones quedando el arreglo de la siguiente manera: conexión de las bombas a la parte superior de la columna por medio de manguera rígida de diámetro nominal de 1/16 de pulgada, de la parte inferior de la columna se conectó al equipo detector UV con la ayuda de un conector Econo-Pac Cartridge para unión de manguera rígida con manguera flexible, del equipo detector de UV al medidor de conductividad nuevamente se utilizó un conector Econo-Pac Cartridge para cambiar de manguera flexible a manguera rígida y finalmente se conectó el medidor de conductividad al colector de fracciones BioRad 2128 por medio de manguera rígida.

Ya instalado el equipo se procedió con la realización de distintos programas evaluando y mejorando cada uno después de un cauteloso análisis; en la Tabla 4 se muestra un resumen de dichos programas. Todas las corridas se realizaron con un flujo constante e igual a 0.5 mL/min. La etapa de adsorción se llevó a cabo alimentando el volumen de la solución de retenido, que se indica en la Tabla 4. En el método A y B, se alimentó el retenido sin NaCl, en los restantes métodos se acondicionó con 0.5 M NaCl. La etapa de lavado se llevó a cabo con buffer TE, en todos los métodos, variando el volumen utilizado en cada uno, como se indica en la Tabla, además en los programas C al G se utilizó buffer TE acondicionado con 0.5 M NaCl.

Tabla 4. Descripción de los Programas de Cromatografía de intercambio iónico

| Método | Adsorción | | Lavado | | Elución | | | | | |
|----------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|
| | Vol (mL) | Molaridad (NaCl) | Vol (mL) | Molaridad (NaCl) | I | | II | | III | |
| | | | | | Vol (mL) | Molaridad (NaCl) | Vol (mL) | Molaridad (NaCl) | Vol (mL) | Molaridad (NaCl) |
| A | 5 | 0 | 5 | 0 | 8 | 0.5 | 7 | de 0.5 a 1.5 | *** | *** |
| B | 4 | 0 | 3 | 0 | 6 | 0.5 | 4 | 0.6 | 5 | de 0.6 a 1.5 |
| C | 5 | 0.5 | 3 | 0.5 | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| D | 1.5 | 0.5 | 1.5 | 0.5 | 2 | 0.6 | 5 | de 0.6 a 1.5 | *** | *** |
| E | 1.5 | 0.5 | 2 | 0.5 | 5 | de 0.6 a 0.7 | 5 | de 0.7 a 1.1 | *** | *** |
| F | 4 | 0.5 | 2 | 0.5 | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| G | 4 | 0.5 | 2 | 0.5 | 6 | de 0.6 a 0.7 | 10 | de 0.7 a 2.4 | *** | *** |

La etapa de elución fue realizada en forma isocrática o por gradiente, según se indica en cada programa de la Tabla. Para realizar la elución se preparó una solución de NaCl 2M en buffer TE y se mezcló con buffer TE sin sal.

En el programa A se realizaron 2 eluciones, una isocrática y otra por gradiente. Cuando se realizó elución isocrática se programó la bomba que alimentaba el buffer TE (bomba A) al 75% y la bomba del NaCl 2M en buffer TE (bomba B) al 25%, (ambas en modo isocrático en el sistema) durante 16 min, para que la mezcla resultante fuera NaCl al 0.5M en buffer TE. En el caso de la elución por gradiente se programó la bomba A para que alimentara el buffer TE de 75% al 25% y la bomba B para que alimentara el NaCl 2M en buffer TE del 25% al 75% (ambas en modo gradiente en el sistema) durante 14 min, para que la mezcla alimentada fuera NaCl en TE con concentración variable de 0.5 a 1.5 M en 14 min.

El modo de operar las bombas en los siguientes programas fue semejante, para obtener los cambios en la molaridad del buffer de elución.

En la Figura 25 se muestra el diagrama de bloques seguido en la etapa de purificación; en el lado izquierdo se sigue etapa de purificación del retenido obtenido directamente de la etapa de

pre-purificación sin acondicionarlo; del lado derecho se observa la etapa de purificación realizando el acondicionamiento del retenido: concentración por medio de ultrafiltración utilizando una membrana de 300 kDa previamente a la cromatografía, así como modificar su molaridad por medio de adición de NaCl para lograr su purificación de una forma más eficiente.

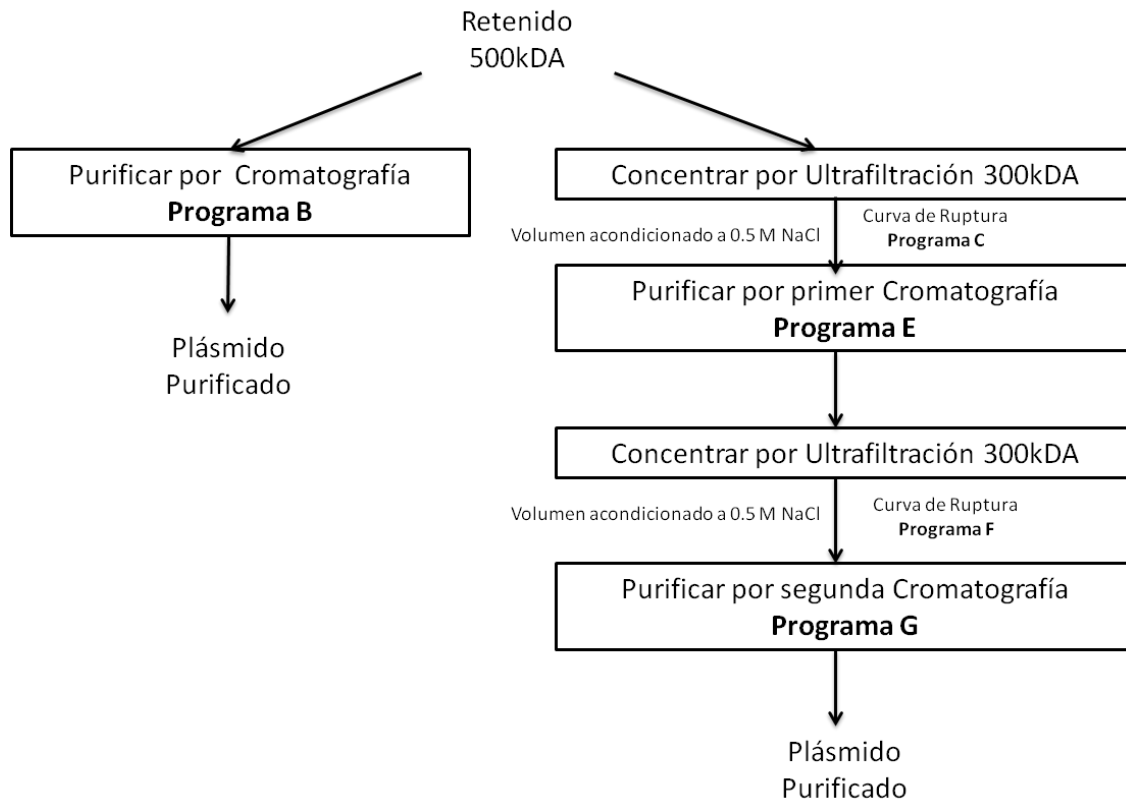


Figura 25. Diagrama de bloques de la etapa experimental para la purificación final del ADNp, por medio de cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico.

3.3.5 Control de calidad del ADN plasmídico

Se realizaron estudios de electroforesis en gel de agarosa para evaluar el estado del plásmido. Se preparó gel de agarosa al 0.8% en buffer Tris 40 mM-Ácido acético 20 mM-EDTA 1mM, pH 8 (buffer TAE 1X) y se colocó en la cámara de electroforesis. Después se vertió el buffer TAE en la cámara hasta el nivel indicado. Se inyectaron las muestras de interés en el gel sumergido en buffer y se dejó correr a 80 volts por cerca de 1h. Se utilizó como marcador 1 μ L de Supercoiled Ladder DNA y 9 μ L de cada muestra. Todas las muestras fueron mezcladas con 1 μ L de buffer de

carga. Se tiñó el gel en una solución 1x de bromuro de etidio, agitándolo a 65 rpm durante 30 minutos. Finalmente, el gel de agarosa se lavó con agua desionizada y se utilizó el equipo MultiDoc-It, Digital System para tomar la fotografía de los geles.

Una vez realizada la prueba de electroforesis se procedió a efectuar la prueba de espectrofotometría en el equipo Uv-Vis NanoDrop ND-1000, se colocó 1 μ l de muestra de las fracciones de interés y por medio del software ND 1000 V3.7.1 se recolectaban los datos, antes de iniciar con las mediciones se colocó una muestra de buffer TE 0.5 M NaCl como blanco, y después de cada muestra se pasaba agua desionizada para efectos de limpieza.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Fermentación

En la propagación celular en matraz de 100 mL, con 30 mL de medio LB inoculado, se alcanzó una $DO_{600} \approx 1.7$, en 7 horas. Con este inóculo se realizó el crecimiento celular en matraz de 2 L con 250 mL de medio LB inoculado, alcanzando una $DO_{600} \approx 3.2$, en 12 horas.

4.2 Recuperación Primaria

Después de la cosecha celular, realizada por centrifugación, que se obtuvo en promedio 8.0 g de células húmedas/Litro de cultivo y se desechó el sobrenadante. Inmediatamente se llevó a cabo la resuspensión de la biomasa, para continuar con la lisis alcalina y neutralización, se obtuvieron en promedio 85 mL de lisado/Litro de cultivo. Finalmente el lisado se clarificó por microfiltración y agregando un volumen de buffer TE.

Se realizó un estudio electroforético del lisado clarificado para verificar el estado del plásmido, se muestra en la Figura 26 el gel correspondiente. Se puede observar en las líneas 4 – 8 las muestras de lisados, donde se aprecia la banda del ADN plasmídico y una gran cantidad de ARN, lo que hace evidente la cantidad de contaminante que se debe eliminar.

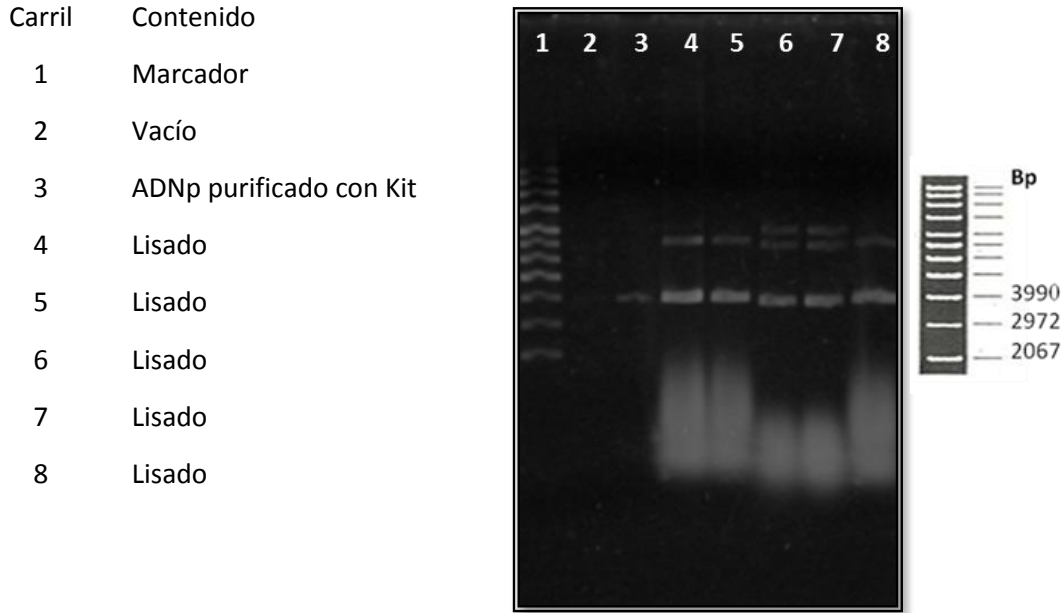


Figura 26. Gel de electroforesis de muestras de lisado.

4.3 Recuperación Intermedia

Para obtener la mejor recuperación de plásmido y remoción de impurezas, se realizó un experimento con lavado continuo con buffer TE del lisado clarificado, utilizando una membrana de fibra hueca con un tamaño de corte de 500 kDa. Las condiciones de operación durante la corrida fue: flujo de alimentación de 50 mL/min, que de acuerdo a las especificaciones del fabricante de la membrana corresponde a un diferencial de presión (ΔP) de 0.75 psig. El volumen del tanque de alimentación se mantuvo constante, debido a que el volumen de filtrado, era reemplazado por un volumen igual de solución de lavado (buffer TE). La ultrafiltración se realizó a partir de un volumen de lisado clarificado de 100 mL con 1.88 Unidades de Absorbancia (AU) a una longitud de onda de 260 nm y conductividad de 26.6 mS/cm. La absorbancia de la solución de retenido se disminuyó hasta un valor de 0.59 AU y una conductividad de 0.09 mS/cm, lo cual indica la remoción del 68 % de contaminantes durante la ultrafiltración. Se utilizaron 350 mL de solución de lavado para alcanzar dicha absorbancia en 184 minutos, que equivale a 3.5 volúmenes de lavado. La figura 27 muestra el perfil de

absorbancia y conductividad del filtrado durante el tiempo de proceso utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 kDa.

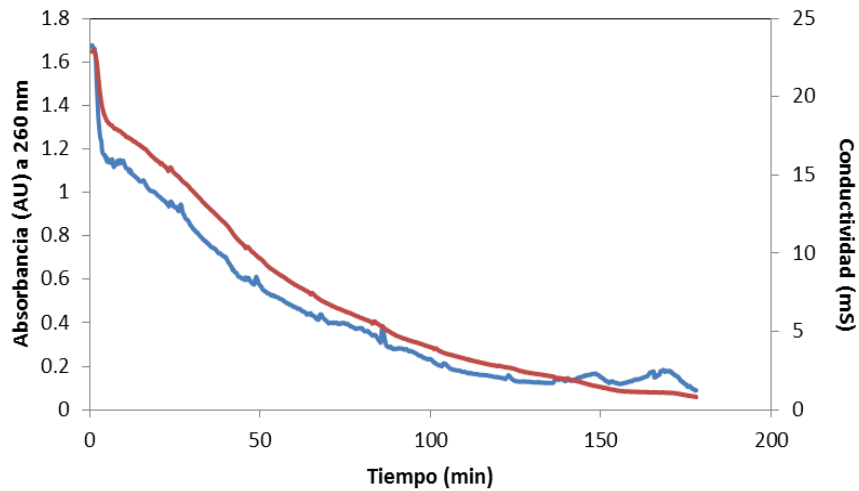


Figura 27. Perfil de absorbancia y conductividad del filtrado utilizando una membrana con tamaño de corte de 500 kDa y flujo 50 mL/min y ΔP de 1.5 psig. — Absorbancia, — Conductividad.

Se realizó un estudio de electroforesis en gel de agarosa de las muestras recolectadas durante el experimento. En la figura 28, se puede observar la disminución de los contaminantes del retenido durante la operación del sistema de ultrafiltración tangencial con la membrana de 500 kDa (líneas 2, 3, 6, 8, 10, 12), sin embargo, se detectó una pequeña pérdida de plásmido a través de la membrana durante los primeros minutos de filtración. Esto puede deberse a la característica de elongación que tiene el plásmido [37]. A pesar de ello, se logra mantener una buena calidad del plásmido en la solución final y una remoción notoria de ARN (Línea 12).

| Carril | Contenido |
|--------|-------------------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | ADNp purificado con Kit |
| 3 | Lisado |
| 4 | Lisado Clarificado |
| 5 | Filtrado |
| 6 | Retenido 500kDa |
| 7 | Filtrado |
| 8 | Retenido 500 kDa |
| 9 | Filtrado |
| 10 | Retenido 500 kDa |
| 11 | Filtrado |
| 12 | Retenido 500 KDa |

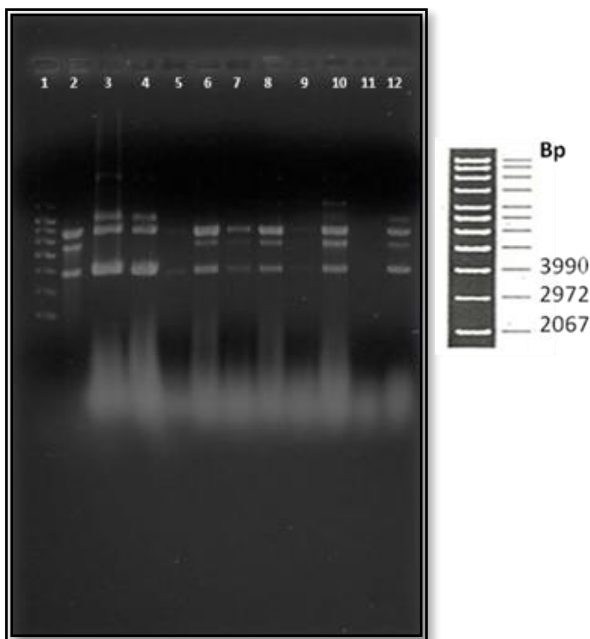


Figura 28. Gel de electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando una membrana de 500 kDa

4.3 Purificación Final

Programa A

El Método A se realizó de acuerdo a los parámetros descritos en la Tabla 4 a un flujo de alimentación constante de 0.5mL/min.

En el cromatograma (Figura 29) se puede observar el comportamiento de la absorbancia medida en unidades de absorbancia (AU, escala izquierda) y de la conductividad medida en miliSiemens por centímetro (mS/cm, escala derecha), en el comportamiento de la absorbancia del retenido a lo largo de la cromatografía son evidentes tres partes importantes, la primera (adsorción) en el periodo de tiempo de 10 minutos iniciales, tiempo en el cual la columna es cargada, el segundo del minuto 10 al 20, fase de lavado, realizada con buffer TE para eliminar las especies débilmente unidas a la membrana y la tercera, del minuto 20 al 50 es la fase de elución.

La elución se realizó en dos partes, la primera realizada en forma isocrática con NaCl 0.5 M en buffer TE, durante 10 min en ésta se desprenden de la columna principalmente ARN y la segunda parte de la elución, realizada por gradiente para aumentar la fuerza iónica con NaCl en buffer TE de 0.5 a 1.5 M. En esta última parte se desorbe de la columna el ADNp concentrado con una cantidad menor de contaminantes en comparación a la solución alimentada.

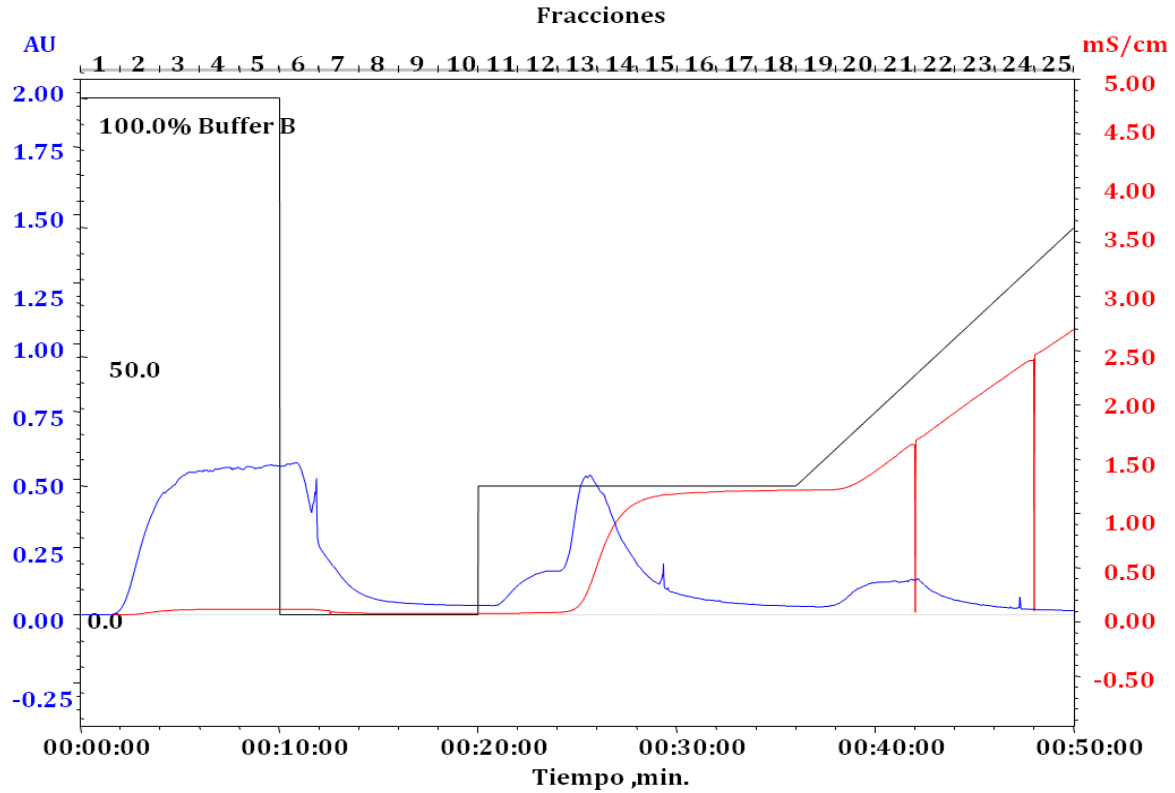


Figura 29. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa A.

En la Figura 30 podemos observar la electroforesis realizada a las fracciones representativas del cromatograma de la Figura 29. En el carril 4 se observa que la formación del segundo pico del cromatograma es resultado de la remoción de contaminantes, principalmente ARN, por efecto de la elución con NaCl 0.5 M en buffer TE. Al aumentar la fuerza iónica de 0.5 a 1.5 M, en el buffer de elución se forma un segundo pico, que es analizado en los carriles 5, 6 y 7 del gel de electroforesis, en estos se puede ver que existe una mezcla de plásmido y contaminantes, ya que aunque en los carriles 5 y 6 hay solo contaminantes en el carril 7 aparece plásmido, sin embargo por la misma acción de coleccionar muestras cada minuto dio como resultado una separación fortuita del plásmido de los demás contaminantes, ya que si comparamos el carril 7 que corresponde a la parte final del segundo pico con el carril 8 podemos ver que el plásmido se encuentra con una mínima cantidad de contaminantes en comparación al retenido que se obtuvo de la ultrafiltración.

| Carril | Contenido |
|--------|---------------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | Fracción 6 |
| 3 | Fracción 12 |
| 4 | Fracción 14 |
| 5 | Fracción 20 |
| 6 | Fracción 21 |
| 7 | Fracción 22 |
| 8 | Retenido alimentado |

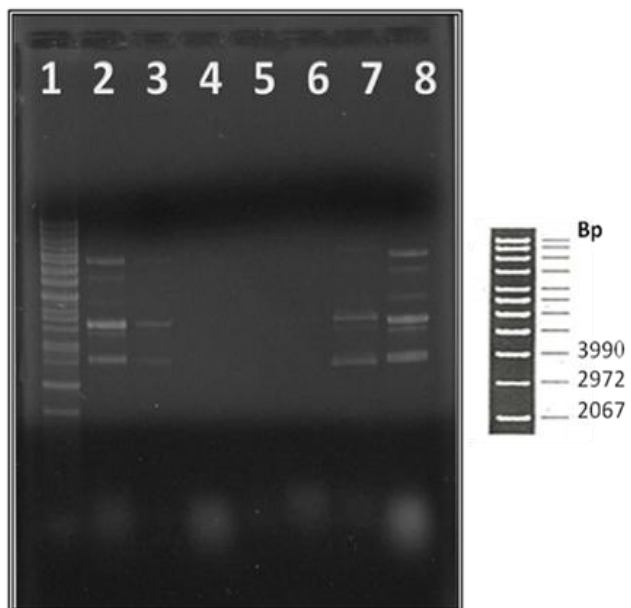


Figura 30. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa A.

Programa B

El programa B se basó en los parámetros descritos en la Tabla 4 a un flujo de alimentación constante de 0.5 mL/min.

Con el fin de lograr un mayor grado de resolución se modificaron los parámetros del método A para así realizar una tercer elución y lograr separar el ADNp del ARN que se obtenía en el segundo pico utilizando el programa A. Se muestra en el cromatograma utilizando programa B (Figura 31), que se realizaron dos eluciones isocráticas con NaCl 0.5 M y 0.6 M respectivamente, dando por resultado dos picos separados. Después se realiza la tercera elución, ahora con gradiente aumentando la fuerza iónica de 0.6 a 1.5 M, en 10 min, obteniéndose un tercer pico.

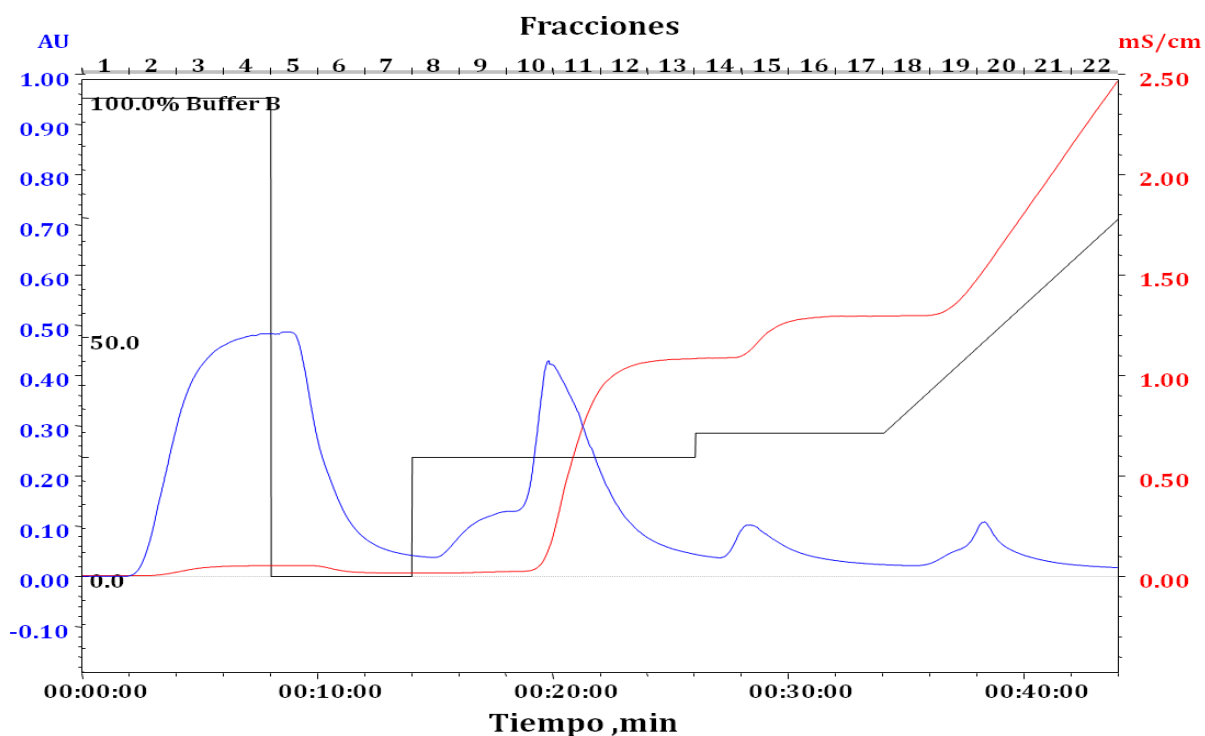


Figura 31. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 4 mL de solución de retenido, utilizando el Programa B.

Una vez concluida la corrida con programa B se procedió a realizar una electroforesis con el fin de identificar la naturaleza de la formación de los picos antes discutidos. En la figura 32 se muestra el gel de electroforesis con las fracciones representativas del programa B.

El primer y segundo pico del cromatograma, (fracciones 11 y 15), se pueden identificar en los carriles 3 y 4 de la Figura 31, estos muestran que contienen ARN y son producto de la elución isocrática con NaCl 0.5 M y 0.6 M. El último pico (fracciones 19, 20 y 21), se identifican en los carriles 5, 6 y 7 de la Figura 32, solo contiene ADNp con una mínima cantidad de contaminantes en comparación al retenido alimentado que aparece en el carril 8.

| Carril | Contenido |
|--------|---------------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | Fracción 5 |
| 3 | Fracción 11 |
| 4 | Fracción 15 |
| 5 | Fracción 19 |
| 6 | Fracción 20 |
| 7 | Fracción 21 |
| 8 | Retenido alimentado |

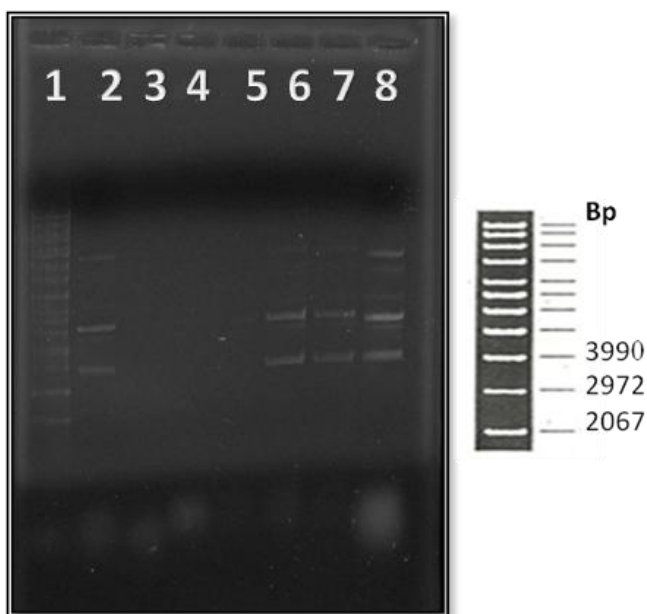


Figura 32. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa B

En base a este resultado, se puede ver que resulta favorable la elución isocrática con NaCl 0.5 M en buffet TE, para eliminar ARN. Por esta razón se procederá a alimentar la solución de retenido con presencia de sal (NaCl 0.5 M) para favorecer a que el ARN no se adsorba en las membranas y no ocupe sitios activos, esperando mejorar la adsorción de ADNp.

Programa C

El programa C se basó en los parámetros descritos en la Tabla 4 a un flujo de alimentación constante de 0.5 mL/min, este programa se realizó con el fin de identificar y optimizar la etapa de adsorción de las nuevas corridas de cromatografías debido a que el retenido es alimentado a una molaridad de 0.5 de NaCl.

En la Figura 33 se aprecia el perfil de adsorción del retenido con NaCl 0.5M utilizando programa C. Esta corrida fue realizada para determinar el tiempo de adsorción del retenido salado, que se utilizó en las corridas de cromatografías posteriores para evitar desperdicio de solución que sale de la columna cuando ésta se equilibra con la solución alimentada.

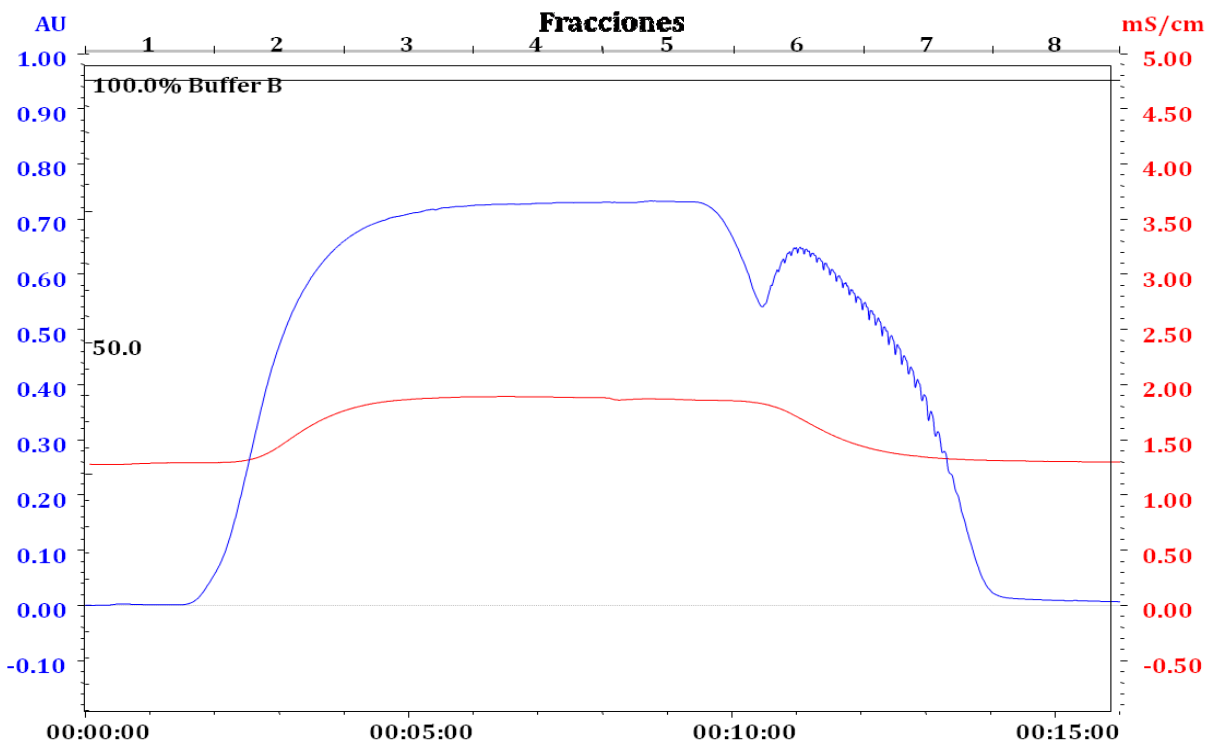


Figura 33. Perfil de adsorción del retenido con 0.5M NaCl, utilizando el Programa C.

En la Figura 34 se puede observar la electroforesis realizada con las fracciones colectadas durante la corrida con el programa C. Se identifica en el primer carril el marcador del plásmido; en el carril 2 se encuentra la muestra obtenida de la fracción 2, en esta se detecta presencia de la solución alimentada. En los carriles posteriores se puede observar que la solución alimentada

se encuentra completamente a la salida de la columna, lo que indica que la columna ha sido cargada y equilibrada. Este resultado es utilizado como referencia para el diseño del programa D que se describe a continuación.

| Carril | Contenido |
|--------|------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | Fracción 2 |
| 3 | Fracción 3 |
| 4 | Fracción 4 |
| 5 | Fracción 5 |
| 6 | Fracción 6 |
| 7 | Fracción 7 |
| 8 | Fracción 8 |

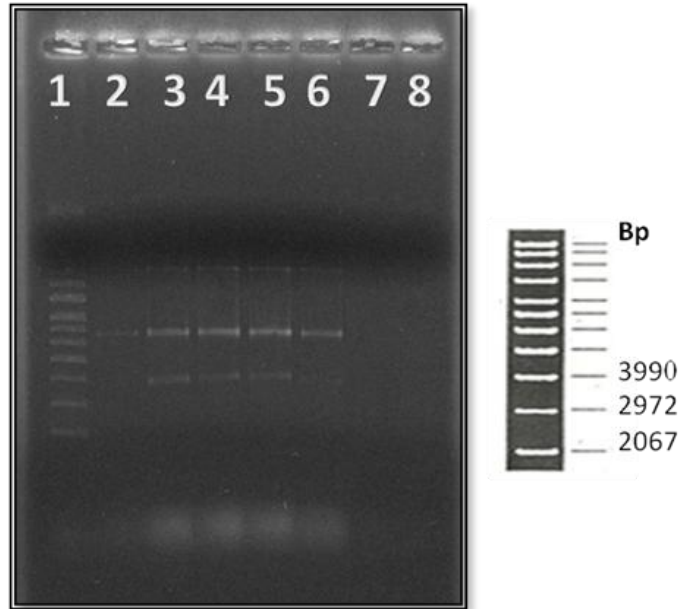


Figura 34. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa C

Programa D

El programa D se basó en los parámetros descritos en la Tabla 4 a un flujo de alimentación constante de 0.5mL/min, este programa se realizó a partir de los resultados obtenidos en los programas A y B, tanto la etapa de adsorción y lavado parten de una molaridad de 0.5 M de NaCl mientras que las fases de elución parten de una molaridad de 0.6 M de NaCl.

La adsorción de la solución de retenido se realizó en presencia de 0.5 M de NaCl para favorecer la no adsorción de ARN, y utilizando únicamente 1.5 mL, ya que en la corrida anterior se determinó que con este volumen es suficiente para equilibrar la columna y así evitar pérdidas de solución alimentada.

En el cromatograma que se muestra en la Figura 35 se puede observar una reducción considerable de tiempo de operación, en comparación a la corrida con el programa B (aproximadamente 24 minutos menos).

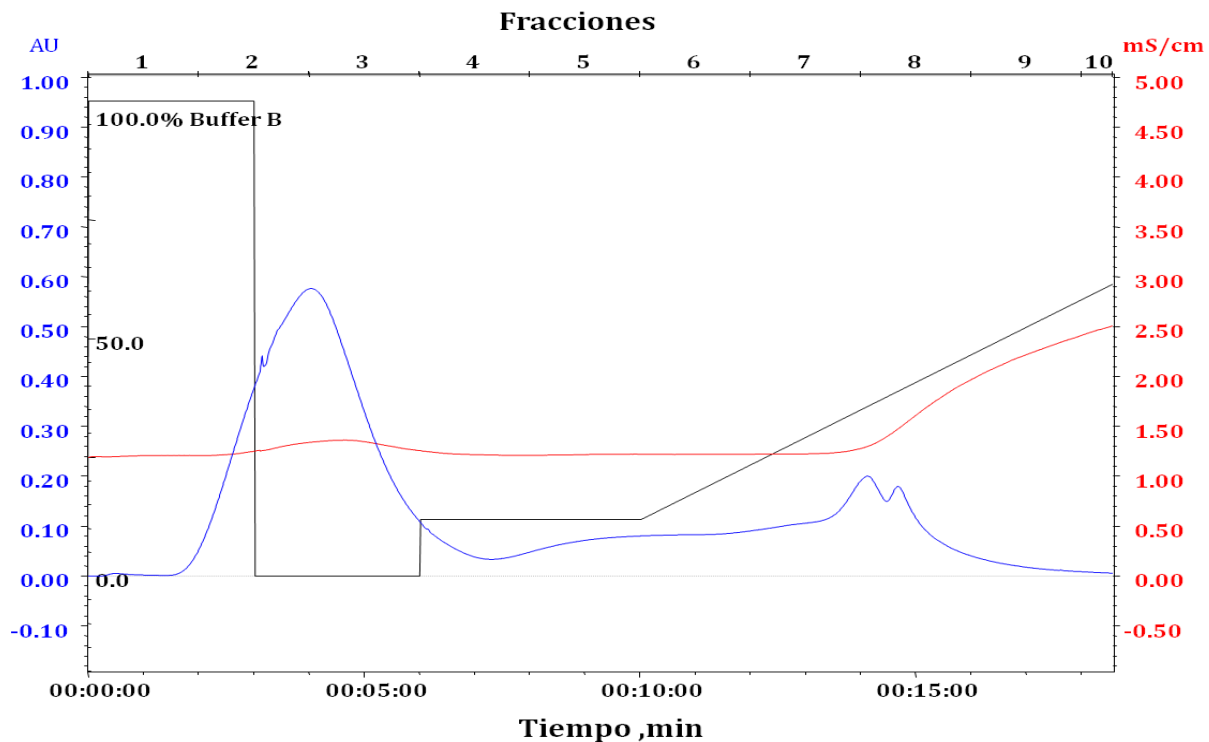


Figura 35. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 1.5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa D.

Durante la elución isocrática se aprecia un incremento en la absorbancia, sin formarse un pico definido y en la elución por gradiente de 0.6 a 1.5 M en 10 min, se forman 2 picos unidos, lo que podría indicar una mala resolución entre el ADNp y el ARN.

Se analizan las fracciones obtenidas a la salida de la columna, por medio de una electroforesis para corroborar su naturaleza. En la Figura 36 se encuentra el gel de electroforesis, en el carril 3 de la figura, se observa una muestra de la fase de lavado, indica que durante esta fase no se desorbió ninguna especie de la columna. Los carriles 4 y 5 corresponden a muestras de la fase elución isocrática con NaCl 0.6 M, aquí se aprecia que existe una eliminación de ARN, al parecer poca cantidad, por la razón que se adsorbió poco ARN por la forma de alimentar el retenido con NaCl. En los carriles 6 y 7 de la Figura 36 se observan las fracciones 7 y 8, correspondientes a los 2 picos formados durante la elución isocrática. En las fracciones se observa la presencia del plásmido y de una cantidad de ARN. En la corrida con este programa se reduce significativamente la cantidad de impurezas en comparación al retenido alimentado (carril 2), sin embargo, no se obtiene una buena resolución entre las fracciones.

| Carril | Contenido |
|--------|---------------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | Retenido alimentado |
| 3 | Fracción 5 |
| 4 | Fracción 6 |
| 5 | Fracción 7 |
| 6 | Fracción 8 |
| 7 | Fracción 9 |

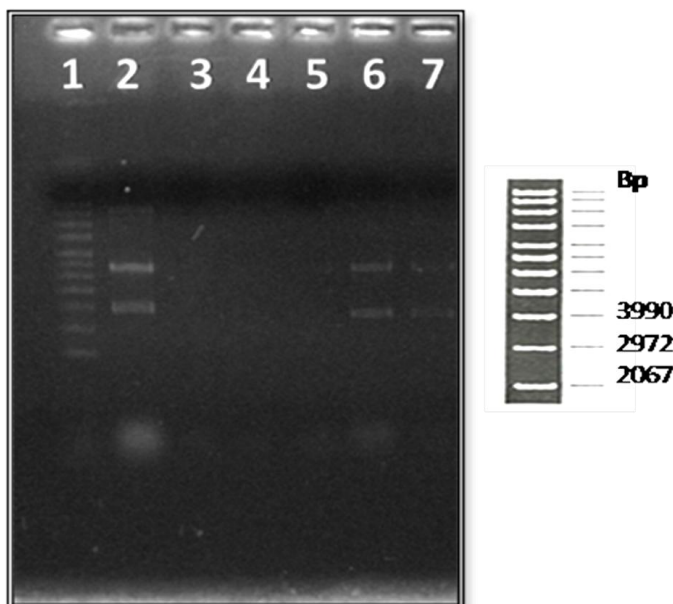


Figura 36. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa D.

Programa E

El programa E se basó en los parámetros descritos en la Tabla 4 a un flujo de alimentación constante de 0.5mL/min. Con el propósito de obtener una mejor resolución entre las especies eluidas de la columna y conseguir el plásmido en un solo pico, se aumentó el tiempo de lavado, así como también se modificó la fuerza iónica en la fase de elución.

En la Figura 37 se muestra el cromatograma correspondiente a la corrida con el programa E. Al aumentar el tiempo de lavado (en comparación a la corrida con el programa D), se logra bajar la absorbancia y eliminar especies débilmente adsorbidas. Ahora la primera elución, en lugar de ser isocrática, se aumentó la fuerza iónica con NaCl de 0.6 a 0.7 M en 10 min y la segunda elución con NaCl de 0.7 a 1.1 M en 10 min, consiguiéndose dos picos separados en el perfil de absorbancia.

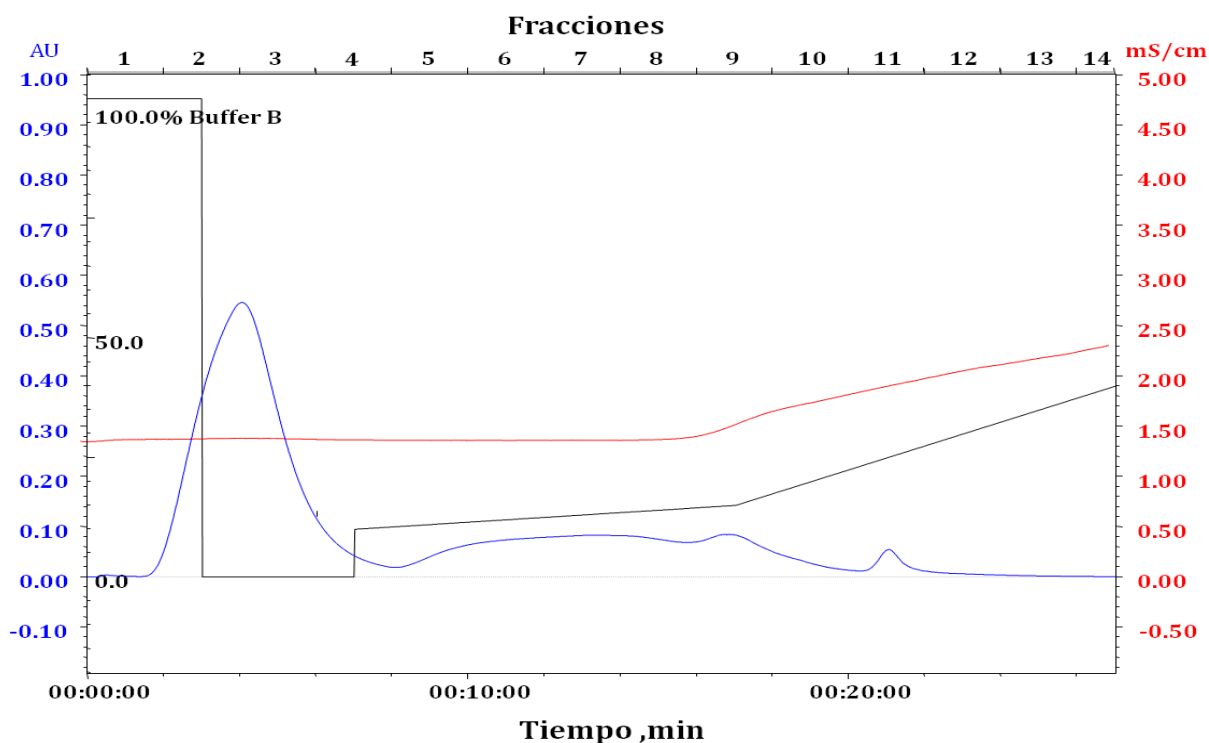


Figura 37. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 1.5 mL de solución de retenido, utilizando el Programa E

En la Figura 38 se muestra el gel de electroforesis de las fracciones obtenidas con el programa E. Las muestras de la fase de lavado se encuentran en los carriles 5 y 6, en estas se observa la eliminación de ARN. Los carriles 7, 8 y 11, 12 y 13 contienen muestras de la primera elución con gradiente, en ellas casi no se observa la eliminación de ARN, sin embargo si se logra separa los picos que se encontraban sobrepuestos en la corrida anterior. Las fracciones correspondientes a la segunda elución con gradiente, se encuentran en los carriles 14, 15 y 16. En particular, en los carriles 15 y 16 aparece ADNp sin presencia aparente de contaminantes (ARN). Al comparar el carril 15 con el carril 2, donde se encuentra la solución de retenido alimentado a la columna, en ambos se observa el plásmido de interés con una diferencia significativa en la cantidad de ARN.

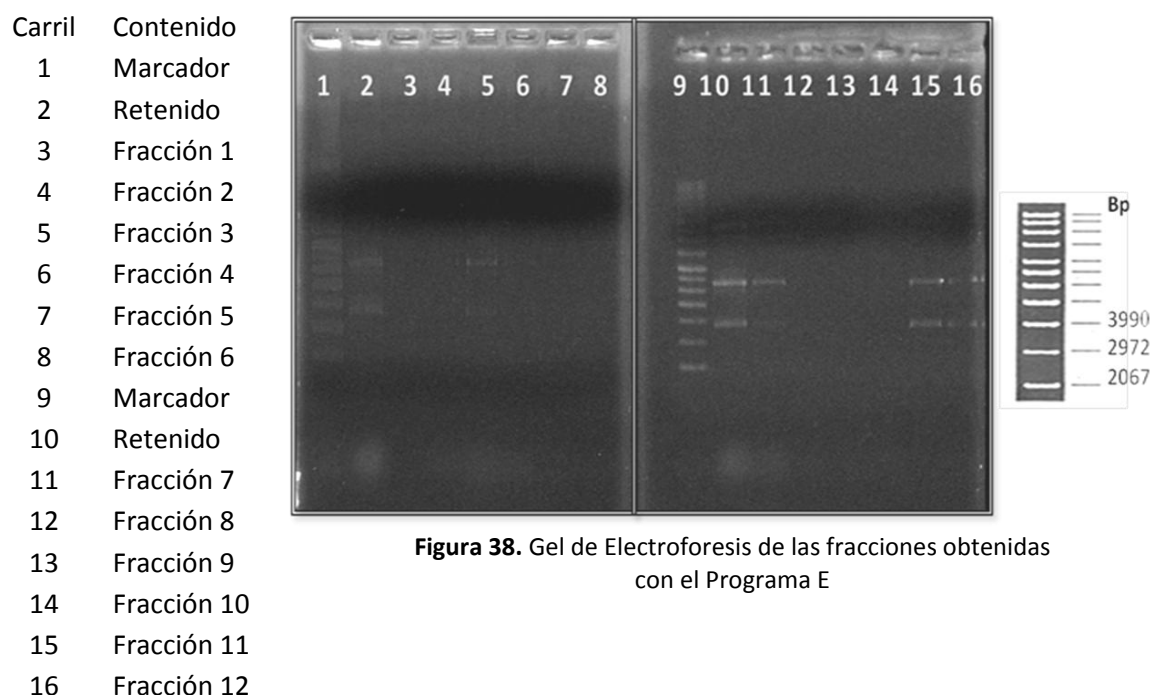


Figura 38. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa E

Programa E múltiples corridas

Ya que se obtuvo la corrida con el programa E, donde existen buenos resultados de recuperación de ADNP, como se muestra en el gel de electroforesis anterior, se realizaron corridas con el mismo programa, con el fin de comprobar la reproducibilidad y obtener un volumen suficiente para realizar la segunda cromatografía para purificar la solución.

En la Figura 39 se observa que el programa E cumple con la propiedad de reproducibilidad experimental. Se observa en la figura los cromatogramas superpuestos, las curvas azules, (absorbancia) bajo las mismas condiciones de operación tiene el mismo comportamiento, obteniéndose al final, en la fracción 11, el pico conteniendo el plásmido que se desea.

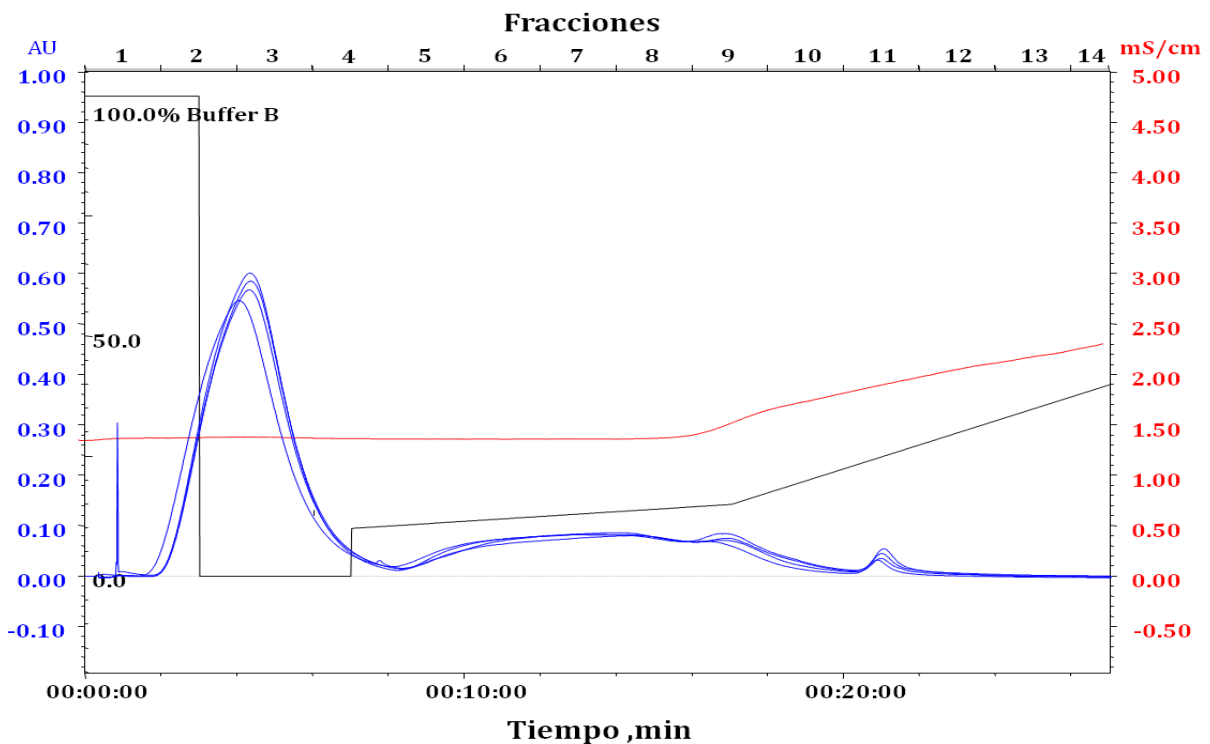


Figura 39. Cromatograma programa E múltiples corridas

Programa F

Al realizar la repetición de la corrida con el programa E, se colectaron los volúmenes de las fracciones conteniendo el ADNp y se reunieron en un solo volumen. Este volumen de plásmido recuperado se procesó en una segunda ultrafiltración con membrana de 300 kDa, con el fin de concentrar la solución, siguiendo el proceso que se muestra en la Figura 25. A la solución concentrada se le agregó NaCl, hasta de obtener 0.5 M, ya que con esta molaridad se alimenta y adsorbe en la columna.

Una vez que se obtuvo la solución concentrada y acondicionada de plásmido recuperado, se realizó una corrida con el programa F el cual se basó en los parámetros descritos en la Tabla 4, a un flujo de alimentación constante de 0.5 mL/min. Esta corrida se realizó con el fin de identificar y optimizar la etapa de adsorción de la corrida de purificación final para evitar desperdicio de solución que sale de la columna cuando ésta se equilibra con la solución alimentada.

En la Figura 40 se muestra el cromatograma del programa F en el cual vemos el comportamiento en la etapa de adsorción y lavado de la columna alimentando la solución concentrada de plásmido recuperado. En comparación a los cromatogramas anteriores se puede apreciar que los niveles de absorbancia son menores, debido a que la solución prácticamente se encuentra libre de contaminantes (ARN) y a las diluciones que se han realizado debido a la metodología del proceso.

En la Figura 41 se puede observar la electroforesis realizada con las fracciones colectadas durante la corrida con el programa F. Hasta en el carril 5, que corresponde a la fracción 6, se detecta presencia de la solución alimentada a la salida de la columna. En los carriles posteriores también se observa el mismo comportamiento que la solución alimentada se encuentra completamente a la salida de la columna, lo que indica que la columna ha sido cargada y equilibrada. Este resultado es utilizado como referencia para el diseño del programa G, en el cual el volumen en la etapa de adsorción debe ser igual o menor de 4 mL para evitar desperdicios de la solución.

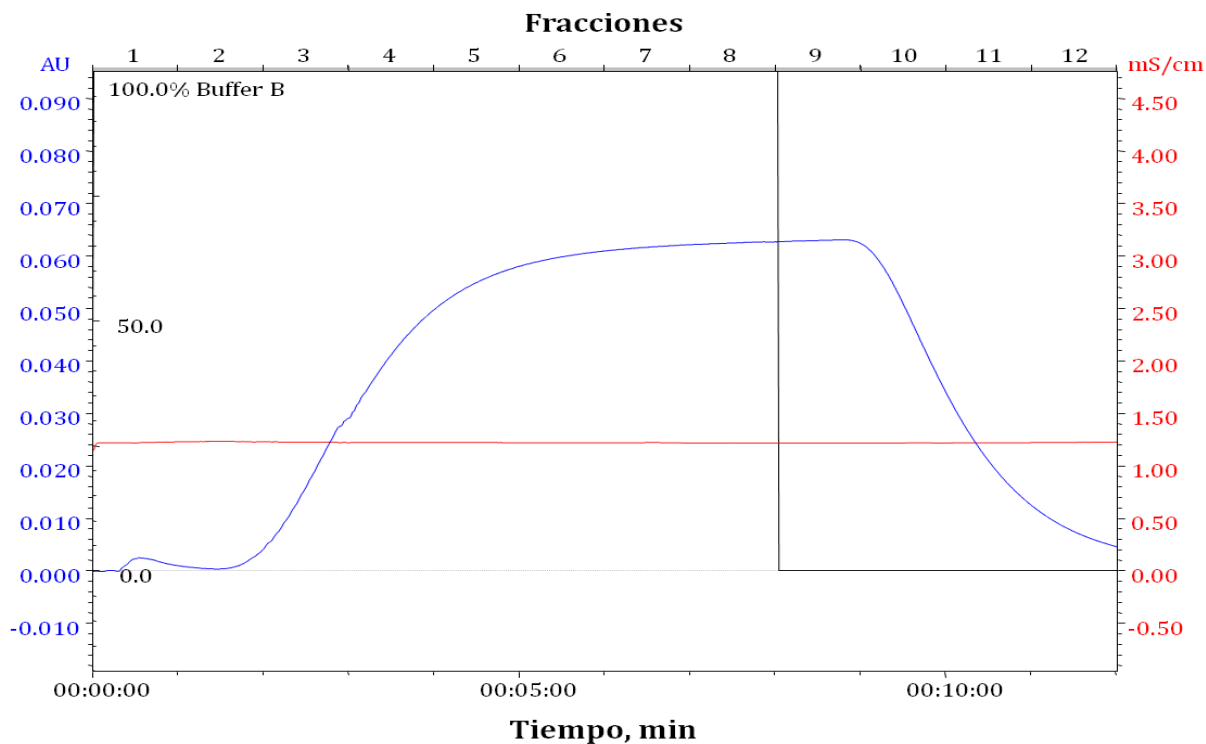


Figura 40. Perfiles de adsorción y lavado de solución concentrada y acondicionada de plásmido recuperado, utilizando el Programa F.

| Carril | Contenido |
|--------|------------|
| 1 | Fracción 2 |
| 2 | Fracción 3 |
| 3 | Fracción 4 |
| 4 | Fracción 5 |
| 5 | Fracción 6 |
| 6 | Fracción 7 |
| 7 | Fracción 8 |
| 8 | Fracción 9 |

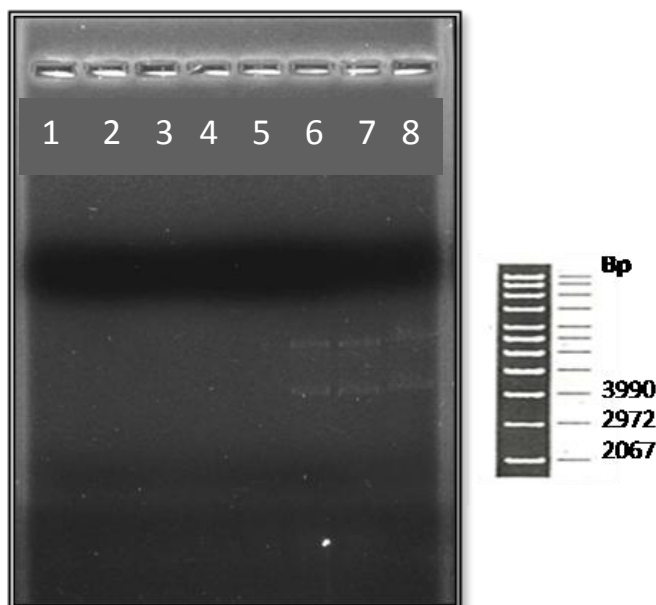


Figura 41. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa F.

Programa G

Para realizar la purificación final del ADNp se realizó una segunda cromatografía para la cual se tomaron como base los resultados del programa F para realizar el programa G. Los parámetros de este programa se presentan en la Tabla 4, todos los flujos fueron constantes a 0.5 mL/min.

En la Figura 42 se muestra el cromatograma de la corrida con programa G. A diferencia de las corridas anteriores, donde las fracciones colectadas eran de 1 mL, en este caso se tomaron fracciones de 0.5 mL con el fin de tener un análisis más preciso cada una de ellas. El perfil de la absorbancia tuvo el mismo patrón del programa E mostrándose la fase de adsorción y de lavado hasta bajar la absorbancia. Durante la primera elución, se aumentó la fuerza iónica con NaCl de 0.6 a 0.7 M en 12 min, no se observa cambio en la absorbancia debido a que la solución alimentada contenía muy poco ARN, y la segunda elución con NaCl de 0.7 a 2.4 M en 24 min, consiguiéndose dos picos separados en el perfil de absorbancia.

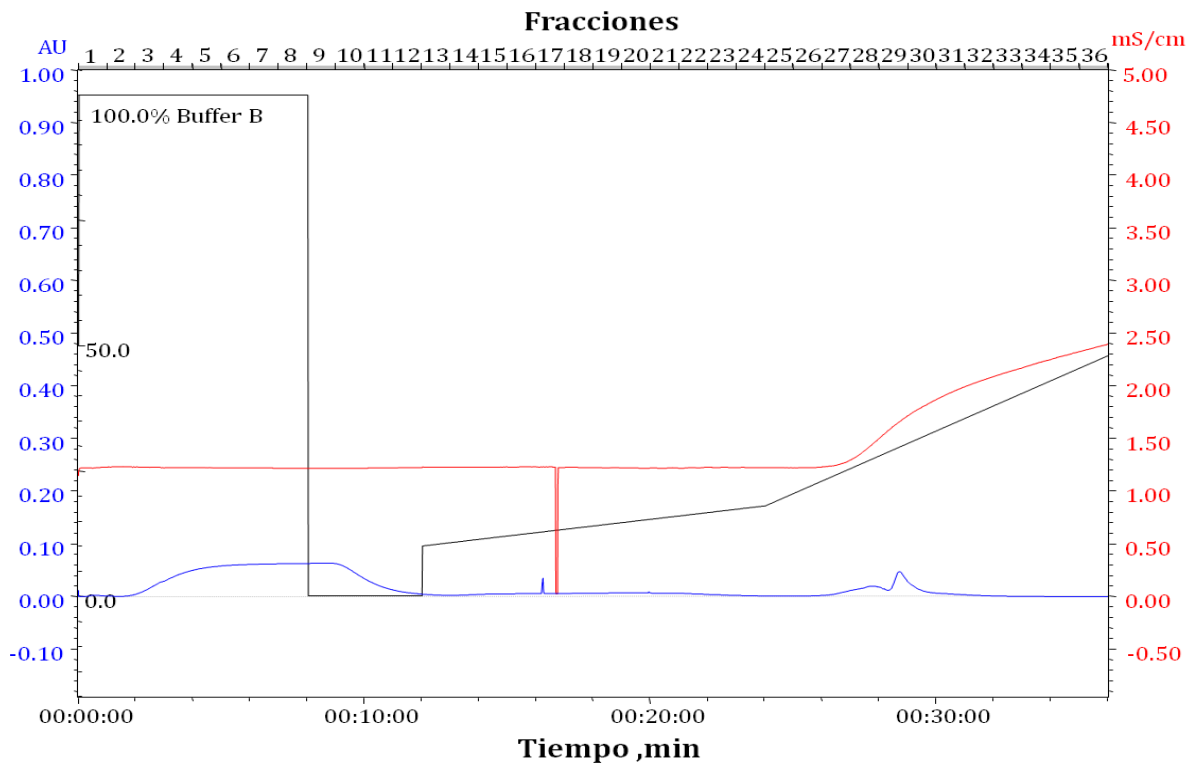


Figura 42. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 4 mL de solución concentrada y acondicionada de plásmido recuperado, utilizando el Programa G

En la Figura 43 se muestra el gel de electroforesis de las fracciones obtenidas con el programa G. Una muestra de la fase de lavado se encuentra en los carriles 3, en esta no se detecta la presencia de alguna especie eliminada de la columna. En los carriles 4 – 8 se encuentran las fracciones correspondientes a la segunda elución con gradiente. En particular, en los carriles 7 y 8 aparece ADNp sin presencia de contaminantes (ARN). Al comparar el carril 15 con el carril 2, donde se encuentra la solución de retenido acondicionado alimentado a la columna, en ambos se observa el plásmido de interés con una diferencia significativa en la cantidad de ARN.

| Carril | Contenido |
|--------|---------------------|
| 1 | Marcador |
| 2 | Solución alimentada |
| 3 | Fracción 10 |
| 4 | Fracción 27 |
| 5 | Fracción 28 |
| 6 | Fracción 29 |
| 7 | Fracción 30 |
| 8 | Fracción 31 |

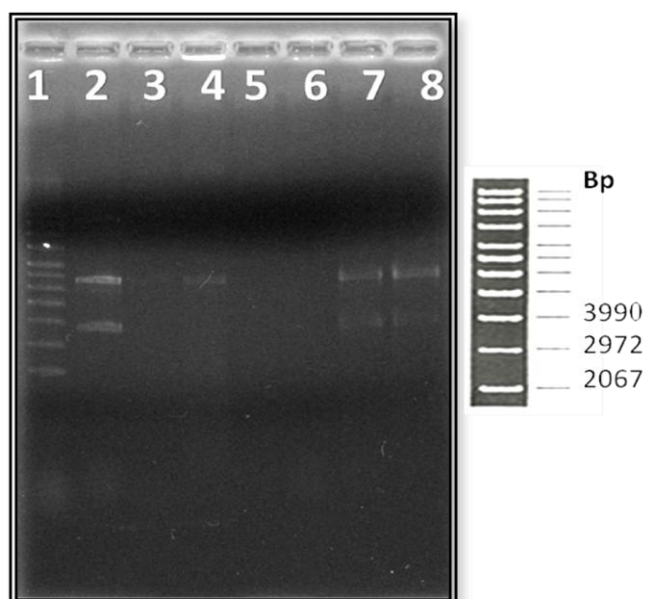


Figura 43. Gel de Electroforesis de las fracciones obtenidas con el Programa G.

4.3 Control de Calidad del ADN plasmídico

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en el equipo NanoDrop 1000. Como se puede observar la relación de OD260/OD280 del retenido inicial es alta mientras que en la solución de plásmido recuperado en la primera operación de cromatografía es 1.7. En la solución de plásmido obtenida en la segunda operación de cromatografía, se logró un valor en promedio de 1.9 y de acuerdo a Isaaq, 2001 y Technical Bulletin, NanoDrop Spectrophotometers, 2009 se considera purificado.

Tabla 5. Resultados espectrofotometría

| Muestra | A260 | A280 | 260/280 |
|--|-------------|-------------|----------------|
| Retenido | 6.080 | 2.985 | 2.04 |
| solución de plásmido recuperado | 0.520 | 0.294 | 1.7 |
| solución de plásmido purificado | 0.575 | 0.305 | 1.9 |

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

A continuación se presentan las conclusiones obtenidas en el desarrollo de esta investigación:

- La etapa de purificación final del pVAX1-LipL32 es viable a nivel laboratorio por medio de la operación de cromatografía en membranas de intercambio iónico.
- La molaridad igual a 0.5 M utilizada en las muestras juega un papel importante en el desarrollo de las cromatografías ya que ayuda a la optimización de los tiempos de equilibrio y lavado.
- Se obtienen resultados satisfactorios cargando la columna con la solución de retenido original sin ninguna modificación.
- Al aumentar la molaridad de la solución de retenido alimentado, aumenta los sitios activos para la adsorción de ADNp, ya que el ARN contenido en la solución alimentada no se adsorbe en la columna, esto reduce el tiempo de operación de la operación de cromatografía, por lo que es más viable y representaría un ahorro significativo al momento de escalar el proceso.
- Es necesario realizar dos corridas de cromatografías para obtener una relación OD260/OD280 de 1.9 la cual es considerada como un resultado óptimo de purificación.

5.2 Recomendaciones

Según los resultados y conclusiones obtenidos en esta investigación, se puede recomendar proceder con la siguiente etapa de investigación con el fin de escalar el proceso, si por algún motivo se presenta un contratiempo por el procedimiento realizado, sería pertinente regresar a la etapa experimental de purificación final y evaluar distintos parámetros como flujos, longitud de empaque de la columna, diámetros de las membranas así como la naturaleza de las mismas. Una recomendación para optimizar el proceso es realizar todas las conexiones con el mismo tipo de tubería (flexible o rígida) con el fin de no utilizar conectores que pueden perturbar el desarrollo del experimento creando caídas de presión o turbulencia en el flujo.

Una manera más práctica de conseguir el tiempo de equilibrio de la columna sería tomando una muestra inicial del retenido analizarla en el equipo NanoDrop y posteriormente recolectar muestras cada determinado tiempo analizando cada una de ellas en el NanoDrop hasta que las relaciones sean las mismas y así poder continuar con las siguientes etapas de la cromatografía.

Debido a la naturaleza de la experimentación de este proceso, el cual debe llevarse de una forma continua es pertinente tener todos los equipos conectados a una fuente alternativa de energía con el fin de evitar sufrir interrupciones por fallas eléctricas, ya sea en el desarrollo de la fermentación, ultrafiltración, la cromatografía, o electroforesis.

REFERENCIAS

- [1]. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 247, 1465 – 1468.
- [2]. Shiver J.W., Emini E.A. (2004). Recent Advances in the Development of HIV-1 Vaccines Using Replication-Incompetent Adenovirus Vectors. *Annu. Rev. Med.* 55 355 – 373.
- [3]. Gottesman M.M. (2003). Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther.*, 10, 501 – 508.
- [4]. Han Y., Liu S., Ho J., Danquah M.K., Forde G.M. (2009). Using DNA as a drug—Bioprocessing and delivery strategies. *Chem. Eng. Res. Des.* 87, 343 – 348.
- [5]. Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartrain M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 865 – 883.
- [6]. Tiainen P., Galaev I., Larsson P. (2007). Plasmid adsorption to anion-exchange matrices: Comments on plasmid recovery. *Biotechnol. J.*, 2, 726 –735.
- [7]. Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *TIBTECH.*, 18, 380 – 388.
- [8]. Leitner W.W., Ying H., Restifo N.P. (1999). DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 18, 765 – 777.
- [9]. Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. (2004). Plasmid DNA purification. *Gene Med.*, 6, S54 – S66.
- [10]. Eon-Duval A., Burke G. (2004). Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B*, 804, 327 – 335.
- [11]. Prazeres D.M.F., Monteiro G.A., Ferreira G.N.M., Diogo M.M., Ribeiro S.C., Cabral J.M.S. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Ann. Rev.* M.R. El-Gewely. Elsevier. Amsterdam. 7, 1 – 30.

- [12]. Smith C. R., De Prince R. B., Dackor J., Weigl D., Griffith J., Persmark M. (2007). Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA. *J. Chromatogr. B.*, 854, 121 – 127.
- [13]. Guidelines for assuring the quality of DNA vaccines. 1977. US Food and Drugs Administration, Rockville, MD, USA..
- [14]. Sandoval E. (2010), Bioproceso para la obtención de un vector de ADN plasmídico de uso potencial como vacuna contra leptospirosis en Sonora. *Tesis de Maestría en Biociencias*. Universidad de Sonora. México.
- [15]. Shuler M.L., Kargi F. (2002), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall.
- [16]. Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartain M. (2003), Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 865-883.
- [17]. Tejada A., Montesinos R.M., Guzmán R. (1995), *Bioseparaciones*. Ed. Universidad de Sonora, México.
- [18]. Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *J. Nucl. Acids Res.*, 7, 1513 – 1523.
- [19]. Zhu K., Jin H., Ma Y., Ren Z., Xiao C., He Z., Zhang F., Zhu Q., Wang B. (2005). A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA. *J. Biotechnol.*, 118, 257 – 264
- [20]. Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L., Cabral J.M.S. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottleneck. *Trends Biotechnol.*, 17, 169 – 174.
- [21]. Freitas S., Canário S., Santos J. A. L., Prazeres D.M.F (2009). Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol. J.*, 4, 265–278.
- [22]. Freitas S.S., Santos J.L., Prazeres D.M.F. (2006). Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.* 22, 1179 – 1186.

- [23]. Gomes, G.A., Azevedo, A.M., Aires-Barros, M.R., and Prazeres D.M.F. (2008). Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Sep. Purif. Technol.*, 65, 22 – 30.
- [24]. Grunwald A., Shields M.S. (2001). Plasmid purification using membrane based anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, 296, 138 – 141.
- [25]. Prazeres D.M F., Schluep T., Cooney C. (1998). Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 806, 31 – 45.
- [26]. Enders H.N., Johnson J.A., Ross C.A. Welp J.K., Etzel M.R. (2003). Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 259 – 266.
- [27]. Ljunglöf A., Bergvall, P., Bhikhabhai R., Hjorth, R. (1999). Direct visualization of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy. *J. Cromatogr. A*, 844, 129 – 135.
- [28]. Teeters M.A., Conrardy S.E., Thomas B.L., Root T.W., Lightfoot E.N. (2003). Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, 989, 165–173.
- [29]. Montesinos-Cisneros R.M., Vega J., Ortega J., Guzmán R., Tejeda-Mansir A. (2007). Breakthrough performance of plasmid DNA on ion-exchange membrane columns. *Biotechnol.Prog.*, 23, 881 – 887.
- [30]. Zhang S., Krivosheyeva A., Nochumson S. (2003). Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 245 – 249.
- [31]. Diogo M.M., Queiroz J.A., Prazeres D.M.F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, 1069, 3 – 22.
- [32]. Diogo M.M., Ribeiro S.C., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Tordo N., Perrin P., Prazeres D.M.F. (2001). Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, 3, 577 – 584.

-
- [33]. Sousa F., Freitas S., Azzoni A.R, Prazeres D.M.F., Queiroz J. (2006). Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 45, 131 – 140.
- [34]. Isaaq H.J. (2001). The role of separation science in proteomic research. *Electrophoresis*, 22, 3629-3638.
- [35]. NanoDrop Spectrophotometers (2009). TECHNICAL BULLETIN
- [36]. Danquah M.K., Forde G.M. (2008). Development of a Pilot-scale Bacterial Fermentation for Plasmid-based Biopharmaceutical Production Using a Stoichiometric Medium. *Biotech. Bioprocess Eng.* 4, 158 – 167.
- [37]. Eon-Duval A., MacDuff R.H., Fisher C. A., Harris M. J., Brook C. (2003), Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal. Biochem.*, 316, 66 – 73.

ANEXOS

ANEXO A. Preparación de Soluciones

Buffer 10 mM Tris/ 1.0 mM EDTA a pH= 8.0. Se pesaron 1.2114 g de tris base y 0.2923 g de EDTA y se disolvieron en 900 ml de agua desionizada. A continuación se ajustó el pH a 8 con gotas de HCl. Cuando la solución tuvo el pH indicado se aforó a un litro con agua desionizada. Posteriormente se filtró a 0.45 μm .

Buffer 1x Tris-Acetato-EDTA (TAE). Se preparó una solución stock 50X, para esto se pesaron 242.28 g de tris base y se agregaron junto con 57.1 ml de ácido acético glacial a 100 ml de una solución 0.5 M EDTA (pH 8). La solución de trabajo se obtuvo diluyendo en agua desionizada el stock preparado a 1 X.

Gel de agarosa al 0.8%. Se pesaron 8 g de agarosa y se disolvieron en 200 ml de buffer TAE. Después se aforó a un litro, se calentó un poco y por último se dejó enfriar.

Buffer de carga. Para preparar buffer de carga 6x (solución de trabajo), se pesaron 2.5 mg de azul de bromofenol, 2.5 mg de xilene cianol FF y 400 mg de sucrosa y se disolvieron en un mililitro de agua desionizada.

Bromuro de Etidio. Para preparar Bromuro de Etidio 1 x, se tomaron .2 mililitros de la solución stock de Bromuro de Etidio 1000 X y se disolvieron en 200 mililitros de agua desionizada.

ANEXO B. Información de seguridad: Bromuro de etidio

El bromuro de etidio es un agente intercalante de ADN. Se utiliza ampliamente en técnicas de biología molecular en los laboratorios. Tiene la particularidad de emitir fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.

Debido a su particular incorporación al material genético se sospecha que representa propiedades mutagénicas porque puede interferir en los procesos normales de replicación del ADN.

El uso de esta sustancia debe llevarse a cabo respetando unas estrictas normas de seguridad.

Incompatibilidades químicas

Esta sustancia no debe ponerse en contacto con oxidantes fuertes.

Efectos adversos contra la salud

Por inhalación puede causar irritación del tracto respiratorio. Puede causar metahemoglobinemia que se caracteriza por mareos, somnolencia, dolor de cabeza, dificultad respiratoria, cianosis (coloración azulada de la piel debido a la deficiencia de oxigenación de la sangre), frecuencia cardíaca rápida. Nocivo si se inhala.

ANEXO C. Información técnica de membranas de Intercambio iónico

Descripción

La Unidad desechable Mustang Q Coin es el producto que acompaña a las cápsulas de Mustang y las membranas cartridges. Las membranas Mustang son un soporte innovador de intercambio iónico con grupos de amina cuaternaria y grupos funcionales orsulfonic en un recubrimiento de polímero reticulado. Los poros en las membranas de Mustang son lo suficientemente grandes para permitir que moléculas tan grandes como las de ADN tengan acceso a todos los sitios de unión por convección directa de fluidos. Este producto cuenta con una alta capacidad de enlace dinámico en comparación con las esferas con poros de difusión. Combinando esta membrana de alta capacidad con un diseño plisado único resulta la línea altamente eficiente de los productos Mustang. Cada unidad Mustang Q Coin contiene 16 capas de membranas. Las Cápsulas y los cartuchos de Mustang son específicamente diseñados para ser desechables para eliminar la limpieza, validación de la limpieza, y la contaminación cruzada. La membrana Mustang Q Coin es la herramienta ideal para la purificación de ADN.

Características y ventajas:

Desechables: no requieren validación de la limpieza.

Eficiencia: Las biomoléculas son unidas en una sola pasada.

Velocidad: Altos flujos permiten el rápido procesamiento de grandes volúmenes.

Escalabilidad: Lineales, del laboratorio a la escala de proceso.

Temperatura máxima de operación: 38 ° C

Condiciones máximas de saneamiento: 1 N NaOH durante 30 minutos (un ciclo único)

Caudal nominal: 3.2 ml / min a 0.5 bar

Diámetro exterior: 18 mm (0.7 pulgadas)