

**CLONACION DE GENES PARA LA OBTENCION DE ANTIGENOS DE
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE: II EXPRESION EN
Escherichia.**

AUTORES: Tenorio Gutierrez V.R. *, García Cuellar C. **
Alvarez de la Cuadra J.** y De la Garza Amaya M.**
INSTITUCIONES: * cenid-Microbiología, INIFAP-SARH, km 15.5
Carretera México-Toluca, 05110 México, **Dpto. Biología
Celular, CINVESTAV, Ap. Postal 14-740, 0700 México, D.F.,
***CIATEJ, Av. Normalistas 800, 44270 Guadalajara, Jalisco.
AREA: SALUD ANIMAL

I N T R O D U C C I O N

El tamizado inmunológico o lisis in situ, es el método más empleado en la indentificación y selección de clonas portadas de antígenos de interés particular, a partir de un banco de expresión de DNA recombinante. Este método puede ser utilizado en bibliotecas genómicas construidas en vectores, tanto en plásmidos como en bacteriófagos (1).

O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo fue seleccionar de las clonas de E. coli, que expresan antígenos de A. pleuropneumoniae (Ap) serotipo 1.

M E T O D O L O G I A

Las clonas de E. coli. fueron tamizadas por el método de inmunológico de lisis in situ utilizando sueros específicos de cerdos convalecientes, vacunados con bacterinas, infectados en condiciones controladas, sacrificados para abasto y que murieron por pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Estos sueros primero fueron absorbiendo con lisados de E. coli y P. multocida

Las colonias se desarrollaron en agar Luria con ampicilina, y se transfirieron posteriormente a papel de nitrocelulosa, donde fueron expuestas por 20 min. a vapores de cloroformo e inmediatamente después se trataron con lisozima y DNasa I. Estos papeles fueron incubados con el primer anticuerpo (sueros de cerdo) durante una noche y finalmente con el segundo anticuerpo (conejo anti-cerdo conjugado con peroxidasa) y se revelaron con diamino bencidina y agua oxigenada. Las clonas positivas fueron probadas para la producción de antígenos: las bacterias fueron cultivadas en caldo Luria con ampicilina, se separaron las células y el medio, ambos fueron mantenidos en baño María por 5 min. con amortiguador de muestra de Laemmli (2) para electroforesis, y las proteínas fueron identificadas por

inmunotransferencia utilizando los mismos anticuerpos mencionados. Nuestros controles positivos fueron extractos totales sobrenadantes de Ap serotipo 1.

RESULTADOS

De las 3 172 clonas que conforman la biblioteca, 32 de ellas fueron positivas en el tamizado inmunológico que se les realizó. Al probarlos por inmunotransferencia, todos los sueros de cerdos reconocieron dos proteínas de alto peso molecular (mayores de 200 kilodaltones).

En los extractos y sobrenadantes de Ap los sueros de los cerdos reconocieron diferentes proteínas del cuerpo bacteriano y de excreción, las que se muestran en tabla 1.

TABLA NO.1

PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS DE CERDOS ENEXTRACTOS TOTALES (ET) Y SOBRENADANTES (SN) DE *A. pleuropneumoniae* POR INMUNOTRANSFERENCIA.

	PM (KD)										
	200	120	106	91	80	70	48	46	42	39	33
ET	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SN			+		+	+		+			+

DISCUSION

El utilizar este método para selección de clonas positivas, nos da la certeza que estan expresando los genes que se encuentran insertados en el plásmido transformante, ya que los sueros positivos que se utilizan para el tamizado fueron adsorbidos con *E. coli* y *P. Multocida* con anterioridad, pues existen reacciones cruzadas entre *A. pleuropneumoniae*. Y estos microorganismos con proteínas de membrana externa (3, 4).

Por otro lado, las proteínas de las clonas de *E. coli* identificadas en las inmunotransferencias, por su peso molecular tan alto y no haber sido identificadas en los controles positivos, podrían deberse a: i) que *E. coli* modificó el inserto de Ap, dando lugar a una proteína más grande que la original, pero que se mantuvieron sin modificación sus epítomos, o que ii) esta sea un conglomerado proteico, y siguen manteniendo su antigenicidad.

El siguiente paso a dar es la determinación y caracterización de estas proteínas y conocer la cantidad de antígenos que la clonas son capaces de exportar al exterior, para con ellos montar técnicas de diagnósticos, como precipitación en gel o ELISA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Helfman, M.D. and Hughes, H.S.: Use of antibodies to

screen DNA expression libraries prepared in plasmid vectors., Methods Enzymol. 152:451-457 (1987).

2.- Laemmli, U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227:680-685 (1970).

3.- Macinnes, I.J. and Rosendals, S.: Analyssi of major antigens of Haemophilus (actinobacillus pleuropneumoniae) and related organisms., Infect, Immun. 55:1626-1634 (1987).

4.- Raap, V.J. and Ross, R.F.: Antibody response of swine to outer membrane components of Haemophilus pleuropneumoniae durin infection., Infect. Immun. 54:751-760 (1960).

Proyecto apoyado por CONACYT (0038-M9106) y CENID-Microbiología INIFAP-SARH.