

# PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE MEMBRANA DE 37kDa ALTAMENTE ANTÍGENICA DEL *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1.

Hernández R.D.F.<sup>1</sup>, Ramírez H.E.<sup>1</sup>, Cruz S.T.<sup>2</sup>, Mendoza E.S.<sup>2</sup>, Hernández-Baumgarten, E. Ciprián C.A.<sup>2</sup>, Romero R.A.<sup>1</sup>  
(1) Laboratorio 8 "Biología Molecular" y (2) Laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Cerdo, Unidad de Investigación y Posgrado, FES-Cuautitlán, UNAM.

## Introducción

Los factores de virulencia descritos de *A. pleuropneumoniae* incluyen la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS), las proteínas de membrana, las proteínas de unión de transferrina (Tbp1 y Tbp2), las proteasas, las toxinas ApX y las fimbrias. Las varias OMPs de *A. pleuropneumoniae* son reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de cerdos infectados. Estas pueden inducirse bajo condiciones de restricción de hierro o adición de maltosa. Aunque difieren para la mayoría de los serotipos. Presentan varias en común, Romero y cols. (2) encontraron un patrón peculiar de dos proteínas en común entre los serotipos 1, 2, 5 y 7 con pesos de 43 y 50 kDa. Se han reportado otras como el péptidoglicano asociado a la lipoproteína PalA de 14 kDa, otra termosensible que varía de 29 a 41 kDa, una principal que varía de 32 a 42 kDa dependiendo del serotipo y una de 48kDa. Otras posibles proteínas de membrana externa son las Tbp's que son expresadas entre los serotipos. Se ha encontrado una proteína de aproximadamente 55kDa que es expresada por varios serotipos que puede estar relacionada junto con la fimbria tipo 4 a la adhesión (1). Para el serotipo 1 se han realizado diversas investigaciones relacionadas con las proteínas de membrana externa, Romero y col (3) describieron una similitud antigénica entre las proteínas de 30 y 24 kDa que fueron reconocidos por anticuerpos de sueros hiperinmunes de dos especies animales diferentes (cerdo y conejo). También se ha identificado proteínas inducidas por choque osmótico en extractos membranales de 11.44, 13.4, 13.88, 40.26 y 65.33 kDa., además se han reportado a las proteínas de choque de calor de 107 y 42 kDa como proteínas con alta inmunogenicidad cuando son enfrentadas con suero de cerdo infectado. (1,2, 3). El propósito de este trabajo fue obtener la proteína purificada de 37kD de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, por los métodos de electroelución y cromatografía de exclusión molecular.

## Material y Métodos

Obtención de extractos membranales y solubilización de extractos membranales. Se realizó de acuerdo a lo reportado por Romero y cols. (3). Electroforesis. Se identificó la presencia de la proteína utilizando la técnica de electroforesis bajo las modificaciones de Romero y cols.(3).

Inmunoelctrotransferencia. Se realizó bajo las modificaciones de Romero y cols. (2) Los papeles con las proteínas transferidas se enfrentaron a sueros de cerdo infectados con pleuropneumonía.

Electroelución. Una vez determinado el patrón electroforético, se procedió a cortar la banda de la proteína de 37kDa utilizando un bisturí esterilizado, el gel fue triturado y colocado en la cámara de electroelución, el circuito fue cerrado conectando el polo positivo en la parte baja de la cámara y el polo negativo en la parte alta, aplicándose una corriente de 200v durante 4hr. Después de transcurrido el tiempo señalado, se transfirió el contenido del recipiente recolector a un tubo eppendorff y se realizó un corrimiento electroforético para determinar la presencia de la proteína en estudio.

Cromatografía de exclusión molecular. Se preparó una columna cromatográfica con sephadex G-25 empaquetándose con PBS. La muestra fue colocada en la parte superior y se corrió utilizándose PBS como eluyente. Se determinaron los picos de salida utilizando luz ultravioleta a 280nm. Los tubos conteniendo los picos de proteínas fueron concentrados y dializados con PBS, realizándose posteriormente una electroforesis y una electrotransferencia.

## Resultados y Discusión.

Se observaron los picos de proteína de la cromatografía de exclusión por sephadex G25 utilizando la muestra obtenido de la electroelución. Los tubos 10 al 25 fueron concentrados para establecer el PM de la proteína purificada. En esta gráfica se identifica perfectamente un solo pico que demuestra la presencia de una sola proteína. El concentrado de los tubos fue analizado por electroforesis e inmunoelctrotransferencia estableciéndose perfectamente la presencia de una proteína de 37kDa. Esta proteína será utilizada para posteriores estudios de patogenicidad y su probable uso dentro del diagnóstico de la PCP y tratamiento.

## Bibliografía

1 Nicolet J., Leman A.D. & Straw B.E. (1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Disease of Swine*, pp. 401-8. 2. Romero R.A., Camacho J., Montaraz A. (1989). Patrones electroforéticos y antigénicos de los extractos membranales del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 3, 5 y 7, Tesis de Maestría, UNAM. 3. Romero R.A., y cols. (1997) Patrones electroforéticos y antigénicos de Ap serotipos 1,3,5 y 7, *Vet. México* 23:125-130.

**Agradecimientos:** Por su asistencia técnica al Sr. Gabino Sánchez, Ing. Draucin Jiménez, MVZ David Trujillo

**Apoyo:** Cátedra "Afecciones Bacterianas y Virales del Cerdo" Proyecto PAPIIT IN223203-2