

Empleo de filtración en gel tipo Sephacryl para la purificación de ARNm IFN leucocitario

JUAN M. GRILLO, ALEJANDRO SILVA, LIDIA I. NOVOA, OMAR GARCIA Y LUIS HERRERA

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)
Apdo. 6996. Habana, Cuba.

RESUMEN

Los leucocitos humanos fueron inducidos con Le-IFN y virus Sendai. Las células fueron recolectadas después de 5 ó 6 horas de incubación.

El ARN de estas células fue extraído por el procedimiento de tiocianato de guanidinio y cloruro de guanidinio.

El ARN poli A fue obtenido por cromatografía sobre oligo(dt)-celulosa y esta preparación fue fraccionada sobre Sephacryl (300, 500 y 1 000). La actividad de ARNm del IFN fue determinada en extractos de oocitos de *Xenopus laevis*, que fueron inyectados con las muestras de ARN.

La actividad de ARNm del IFN encontrada con el Sephacryl 500 llegó a ser superior a 5 000 U/ μ g de ARN, por lo que este procedimiento de fraccionamiento resultó rápido, seguro y poco costoso en la purificación del ARNm del IFN.

SUMMARY

Human leukocytes were primed with Le-IFN and induced with Sendai virus, cells were incubated and harvested after 5 or 6 hours.

RNA from these cells was prepared by the guanidine thiocyanate/guanidine hydrochloride procedure.

Oligo(dt)-cellulose chromatography was used to obtain poly A-RNA and this preparation was fractionated on Sephacryl (300, 500 and 1 000). The IFNm-RNA activity was determined from homogenised *Xenopus laevis* oocytes that were injected with the RNA samples.

The IFNm-RNA activity obtained with Sephacryl 500 was higher than 5 000 U/ μ g, therefore this procedure of fractionation was shown to be a secure, rapid and non expensive method for IFNm-RNA purification.

INTRODUCCION

El aislamiento de ARNm de interferón intacto y biológicamente activo es de gran importancia para el clonaje de sus genes correspondientes. Sin embargo, lograr esto a partir de leucocitos humanos inducidos, es en extremo difícil a causa de los altos niveles de nucleasas presentes en dichas células (Mc Candliss *et al.*, 1981). Por ello, se ha desarrollado un grupo de métodos que han solucionado los problemas de degradación del ARN durante la extracción (Chirgwin *et al.*, 1979; Berger *et al.*, 1981).

También desempeña un papel importante para los objetivos de clonaje, el grado de enriquecimiento que se logre en el ARNm de IFN, pues estas moléculas constituyen una población de ARNm minoritaria. En la literatura se describen dos variantes fundamentales de fraccionamiento del ARN-poli A de IFN. Una es sobre centrifugación en gradiente lineal de sacarosa (Nagata *et al.*, 1980; Maeda *et al.*, 1980) y la otra en geles de agarosa con condiciones desnaturizantes (6 M urea, Gray *et al.*, 1982 o con 5 mM hidróxido de metilmercurio, Holland y Wangh, 1983).

En el presente trabajo reportamos la purificación de un ARN-poli A de IFN y exponemos un método de fraccionamiento por cromatografía sobre Sephacryl 500. Este procedimiento de dicho material, además de ser rápido, seguro y poco costoso, permitió obtener actividades superiores a 5 000 U IFN por μ g de ARN inyectado a los oocitos de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los leucocitos

Los leucocitos provenientes de donantes fueron inducidos según el procedimiento descrito por K. Cantell (1981).

A las 5 ó 6 horas después de la adición del virus, las células fueron enfriadas y recolectadas por centrifugación a 2 500 rpm durante 15 min. Estas células fueron resuspendidas en PBS (0,14 M NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM H₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄) y finalmente vueltas a centrifugar. Las células así obtenidas se conservaron a -70°C hasta el momento de la ruptura.

Purificación de ARN

Todos los experimentos con ARN se realizaron en recipientes que habían sido horneados durante 12 horas a 120°C o tratados con dietil pirocarbonato, las soluciones también fueron sometidas a este agente cuando así lo requería y era posible.

El ARN se obtuvo siguiendo lo descrito por Chirgwin *et al.* (1979), con las modificaciones de R. Mc Candliss *et al.* (1981). El método consistió en lo siguiente: los leucocitos a -70°C se sumergieron en nitrógeno líquido durante 10 min; el pellet congelado fue pulverizado en el frasco y adicionado a una solución de tiocianato de guanidinio 4 M, B-mercaptoetanol 0,1 M, Tris. HCl 0,1 M pH 7,5 (solución A). A cada gramo de peso húmedo de células se le añadió 20 ml de la solución A. Inmediatamente después se sometió a homogenización en un equipo Virtis al máximo de la velocidad (20 000-23 000 rpm) durante 2-4 min. Esta suspensión fue sonicada en un equipo Branson durante 10 x 30 segundos, al máximo de intensidad. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, a 4°C y al sobrenadante se le añadió 0,04 volúmenes de ácido acético 1 N más 0,5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -20°C durante 2-3 horas. El precipitado se recolectó por centrifugación a 10 000 g durante 10 min

a -10°C , y fue disuelto en 0,5 volúmenes de solución B (cloruro de guanidinio 6 M, 10 mM EDTA pH 7,0; DTT 10 mM). Para disolver el precipitado se agitó y calentó a 70°C durante 10 min. Posteriormente se le añadió 0,04 volúmenes de ácido acético 1 N y se enfrió la solución a 0°C antes de añadir 0,5 volúmenes de etanol absoluto. De inmediato se colocó a -20°C durante una hora y se centrifugó a 6 000 g durante 10 min a -10°C . El precipitado se disolvió en 0,5 volúmenes (con respecto al anterior) de la solución B. Para la disolución se procedió de la misma forma que en el paso anterior y después de la adición de 0,04 volúmenes de ácido acético 1 N y 0,5 volúmenes de etanol absoluto permaneció a -20°C por una hora para obtener el precipitado por centrifugación a 6 000 g durante 10 min a -10°C .

El precipitado fue lavado con etanol al 70%, secado al vacío y disuelto en agua para eliminar las suciedades por centrifugación a 10 000 rpm a 4°C .

Los restos de proteínas presentes en la muestra fueron extraídos mediante tratamiento con fenol y cloroformo y posteriormente el ARN fue concentrado por precipitación etanólica.

Obtención de ARN poli A. Fraccionamiento y detección de la actividad del IFN

Obtención de ARN poli A

El método empleado para la obtención de ARN-poli A fue, en lo fundamental, según lo descrito por Aviv y Leder (1972) y Bantle *et al.* (1976). A este procedimiento se introdujeron modificaciones procedentes de un método analítico descrito por Caput*. Finalmente, consistió en lo siguiente:

- 10 mg de ARN total disuelto en agua a una concentración de 2-4 mg/ml fueron calentados a 60°C durante 5 min. A esta temperatura, se le añadió Tris pH 7,5; SDS; LiCl para alcanzar concentraciones finales de 0,01 M; 0,2% y 0,5 M respectivamente. Este material fue mezclado con 1 g de oligo (dT) celulosa (Sigma), previamente calentada hasta 60°C , se dejó a esta temperatura durante 3 min y posteriormente, a temperatura ambiente, 30 min; se centrifugó a 1 000 rpm durante 10 segundos, se lavó la resina hasta que la densidad óptica a 260 nm en el sobrenadante fuera menor o igual a 0,02. La elución se efectuó con el buffer Tris 0,01 M pH 7,5 y SDS 0,2% calentado 3 min a 60°C y enfriando rápidamente en baño a 15°C .

Los sobrenadantes provenientes de las aplicaciones y de los lavados fueron de nuevo procesados para obtener una mayor recuperación. .

Fraccionamiento sobre columnas de Sephacryl

De 400-600 μg de ARN-poli A fueron aplicados a una columna de Sephacryl (300, 500 y 1 000) 10 x 40 cm, previamente equilibrada con Tris 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 10 mM y SDS 0,05%. Se colectaron fracciones de 0,8 ml, las cuales fueron sometidas a tratamiento con fenol, cloroformo, precipitación etanólica, secado, disolución en agua y ajuste a concentración superior a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Centrifugación en gradiente de sacarosa

180 μg de ARN- poli A fueron aplicados sobre un gradiente lineal del 5 al 20% de sacarosa en el tampon Tris-HCl, 50 mM pH 7,5; NaCl, 150 mM; EDTA, 10 mM. La corrida se efectuó

* Comunicación personal

en el rotor RPS 40 T de la ultracentrífuga Hitachi 70P-73 a 30 000 rpm durante 15,5 horas, con temperaturas de 5°C.

Se colectaron fracciones de 1 ml, las cuales fueron tratadas de igual forma que la descrita para las cromatografías sobre Sephacryl.

Electroforesis del ARN

El método de electroforesis que se empleó fue el de agarosa-formol-dehído descrito por Lehrach *et al.* (1979), siguiendo las modificaciones hechas por Maniatis *et al.* (1982). En nuestro laboratorio se sustituyó el ácido morfolinopropano sulfónico (MOPS) por el ácido morfolinoetanosulfónico (MES).

Las muestras, para ser corridas en este gel, se prepararon disolviendo hasta 20 µg de ARN en 4,5 µl de agua, 2,0 µl de 5 x tampón de corrida, 3,5 µl de formaldehído y 10 µl de formamida. Las muestras se incubaron a 55°C por 15 min y posteriormente se les añadió 2 µl de tampón de aplicación consistente en glicerol; 50%; EDTA, 1 mM; bromofenol azul, 0,4%; xileno cianol 0,4%. La corrida se efectuó en un minigel a 50 v durante 40 minutos.

Traducción del ARNm de IFN en oocitos de *Xenopus laevis*

Esta traducción se efectuó, en lo fundamental, según el procedimiento descrito por A. Sloma *et al.* (1981).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 aparecen los valores de actividad del IFN por ml de los crudos procesados, los gramos de células y los miligramos de ARN total obtenidos. Como se puede apreciar, se obtuvo entre 1,2 y 2,4 mg de ARN total por gramo de células. Estos resultados son similares a los reportados por R. Mc Candliss *et al.* (1981).

Tabla 1

Muestra	Horas	U IFN/ml	g células	mg ARN totales	mg/g
L 83-1	5	8×10^3	10,2	16,4	1,6
	6	$1,2 \times 10^4$	8,0	10,5	1,3
L 83-2	5	$3,2 \times 10^4$	5,0	9,5	1,9
	6	$2,2 \times 10^4$	5,1	8,3	1,6
L 83-6	5	$1,9 \times 10^4$	22,2	40,0	1,8
	6	$1,9 \times 10^4$	25,0	60,0	2,4

TABLA 1. Resultados de la extracción de ARN total de leucocitos humanos. En la misma aparecen las muestras procesadas, horas de extracción, Unidades de IFN por ml de los crudos, los gramos de células totales de partida para la extracción, miligramos de ARN total obtenidos y el rendimiento dado por los miligramos de ARN total entre gramos (peso húmedo) de células.

La integridad de este material fue controlada por electroforesis (resultados no mostrados). La nitidez de las bandas de los ARN 28S y 18S y la ausencia de material en las regiones correspondientes a bajos pesos moleculares se consideró un indicador de la integridad del material.

Otro método empleado para controlar la integridad del ARN consistió en cromatografiar sobre Sephacryl 300 el ARN obtenido y estudiar el perfil de absorción a 260 nm de la elución. En la figura 1 aparecen los resultados con las muestras L-83-3 y L-83-1 H₅. La primera correspondió a un ARN que presentaba en la electroforesis evidencias de estar degradado y su patrón de elución con el Sephacryl 300 era marcadamente diferente al de la muestra L-83-1 H₅ que mostró integridad en la electroforesis. Este procedimiento fue aplicado a todas las muestras y todas las que tuvieron un patrón electroforético de integridad, mostraban perfiles similares en Sephacryl 300 al L-83-1 H₅. Por lo tanto, la presencia de absorción entre el pico de elución y el correspondiente al ARN_{5s} y ARN_t fue interpretado como indicativo de degradación del ARN.

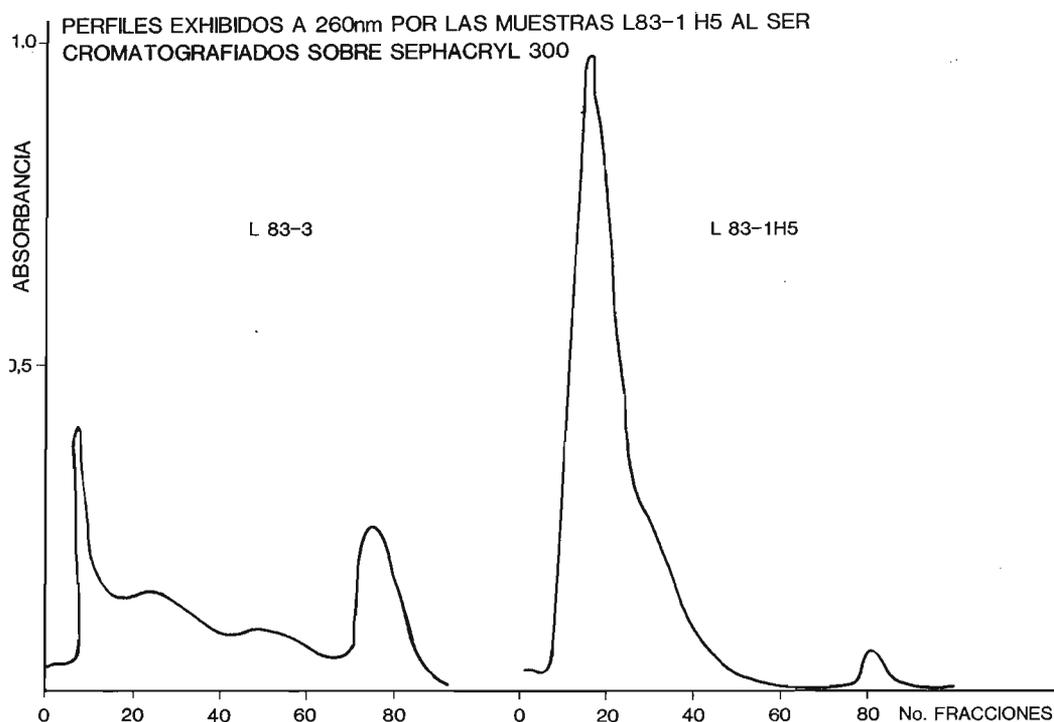


FIG. 1. Perfiles de absorción exhibidos a 260 nm por las muestras L-83-3 y L-83-1H₅ al ser cromatografiados sobre Sephacryl S-300.

Para la obtención del ARN poli A por cromatografía sobre oligo-(dT)-celulosa se realizaron diferentes ensayos para optimizar el rendimiento de ARN rico en ARNm del IFN.

Ellos fueron: una sola aplicación con lavado de LiCl, 0,5 M o dos aplicaciones con lavado la primera vez con LiCl, 0,5 M y la segunda, lavado con LiCl, 0,5 M (o LiCl, 0,2 M). Los resultados son mostrados en la tabla 2 donde aparecen los valores de la actividad de IFN por μg de ARN inyectado de las diferentes muestras; los valores de IFN por μg no resultaron significativos para los diferentes procedimientos, por lo que se decidió hacer una sola aplicación para todas las muestras sobre oligo-(dT)-celulosa con un lavado de LiCl, 0,5 M.

Tabla 2

Muestra	Conc. de LiCl empleada en el lavado	IFN (U/ μ g)		
L-83-1	0,5 M	4		
L-83-2	0,5 M	8		
L-83-6 H ₅	0,5 M	60 ^a	37 ^a	
L-83-6 H ₅ ^c	0,5 M	0		
L-83-6 H ₅ ^c	0,2 M	0		
L-83-6 H ₆	0,5 M	30		
L-83-6 H ₆ ^c	0,5 M	174		
L-83-6 H ₆ ^c	0,2 M	0		
L-83-7	0,5 M	30 ^b	3 ^b	0 ^b
L-83-14	0,5 M	0	0	

TABLA 2. Actividad de IFN por μ g de ARN poli A inyectado a oocitos de *Xenopus laevis*.

a Dos determinaciones

b Tres determinaciones

c Estas muestras fueron aplicadas dos veces sobre oligo-(dT)-celulosa; la primera aplicación se lavó a una concentración de LiCl 0,5 M y la segunda a la concentración indicada.

En la tabla 3 aparecen los valores obtenidos de ARN-poli A por mg de ARN total procesado. Se puede apreciar que el rendimiento osciló entre 1,2% y 6%, lo cual es similar a lo reportado por otros autores (Nagata *et al.*, 1980 y Mc Candliss *et al.*, 1981), para leucocitos.

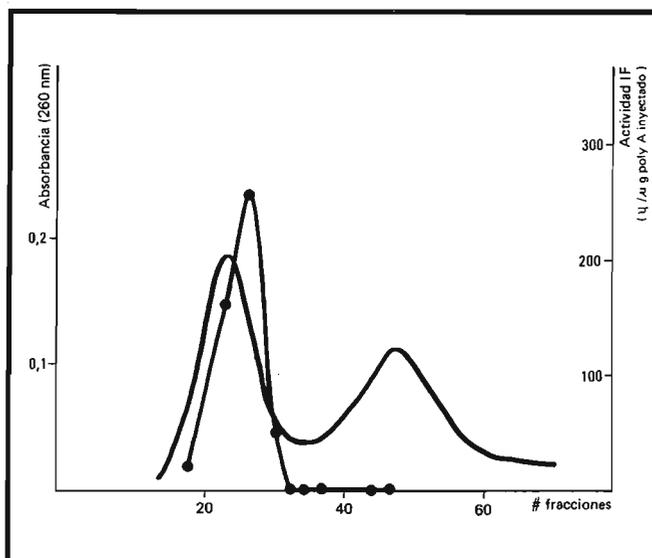
Tabla 3

Muestra	ARN	ARN poli A	% Rendimiento
L-83-1	25 mg	0,3 mg	1,2
L-83-2	8,35 mg	0,2 mg	2,3
L-83-6 H ₅	40 mg	1,1 mg	2,8
L-83-6 H ₆	60 mg	2,5 mg	4,0
L-83-7	25 mg	1,4 mg	6,0
L-83-14	38 mg	1,2 mg	3,0

TABLA 3. Valores de ARN poli A por mg de ARN total procesado.

La figura 2 muestra los perfiles de absorción a 260 nm y la actividad de IFN por μ g de ARN inyectado al ser fraccionados los ARN poli A sobre los diferentes tipos de Sephacryl (300, 500 y 1 000). Los valores máximos de actividad de IFN por μ g de ARN inyectado fueron de 276, 1 820 y 445 para el Sephacryl 300, 500 y 1 000 respectivamente. En la mencionada figura aparece el fraccionamiento de otra muestra sobre el Sephacryl 500, y en esta ocasión se lograron actividades de 6 500 U por μ g de ARN inyectado. Este último resultado confirma

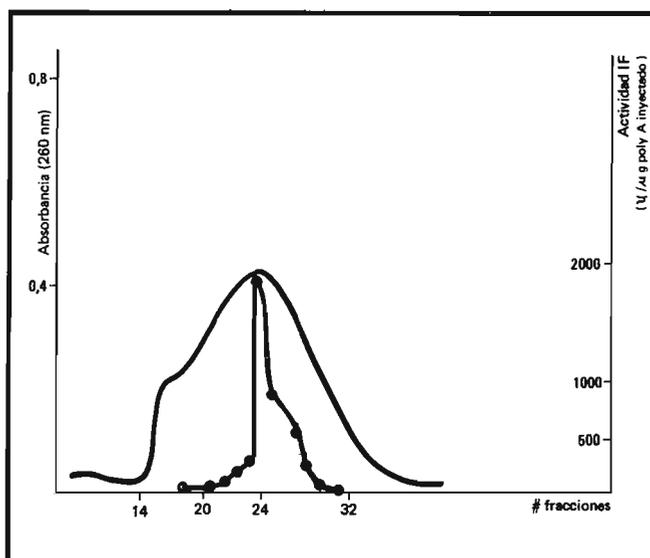
SEPHACRYL 300



Muestra : L-83-2
Columna : 16/30
Vol. fracciones : 1 ml

a

SEPHACRYL 500

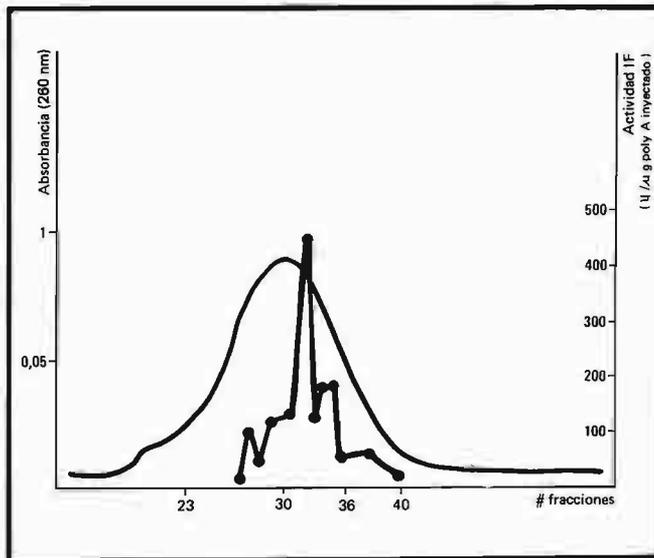


Muestra : L-83-6H6
Columna : 10/35
Vol. fracciones : 0.8 ml

b

FIG. 2. (a y b) Perfiles de absorción exhibidos a 260 nm del fraccionamiento de muestras de ARN poli A al ser cromatografiados sobre diferentes tipos de Sephacryl y la distribución de la actividad IFN (U por μ g ARN inyectado).

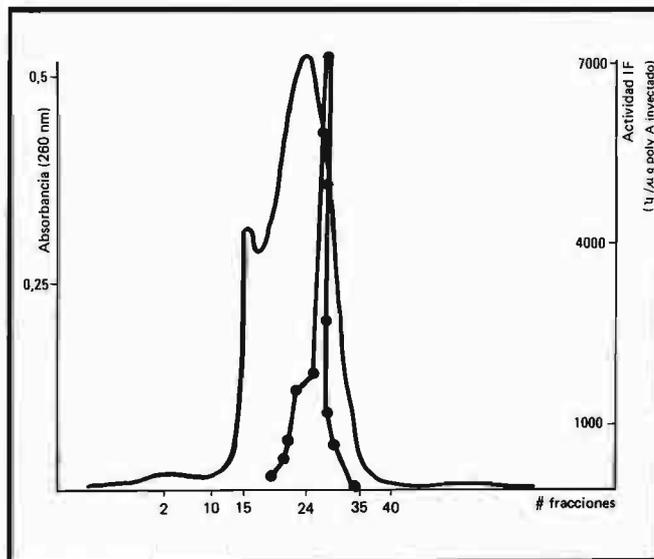
SEPHACRYL 1000



Muestra : L-83-6H6
Columna : 10/30
Vol. fracciones : 0,8 ml

c

SEPHACRYL 500



Muestra : L-83-6H5
Columna : 10/30
Vol. fracciones : 0,8 ml

d

FIG. 2. (c y d) Perfiles de absorción exhibidos a 260 nm del fraccionamiento de muestras de ARN poli A al ser cromatografiados sobre diferentes tipos de Sephacryl y la distribución de la actividad IFN (U por μ g ARN inyectado).

que el Sephacryl 500 resulta el más adecuado de los tres empleados y permite obtener preparaciones de ARN enriquecidas en ARNm IFN superiores a los reportados por otros autores.

La figura 3 muestra un ensayo de fraccionamiento del ARN poli A sobre un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20%. El valor máximo de actividad encontrada con este procedimiento fue de 875 U IFN por μg ARN, esto es superior al Sephacryl 300 y 1 000, pero inferior al 500.

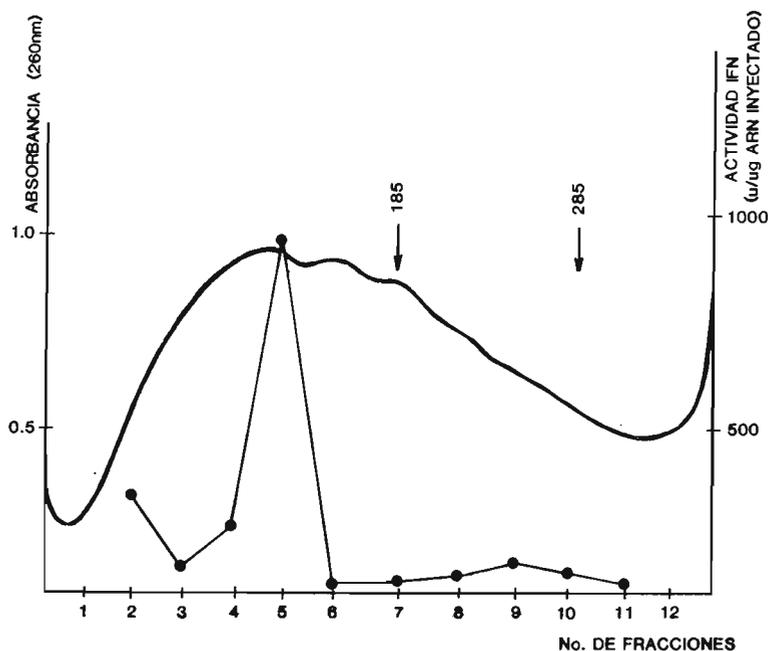


FIG. 3. Perfil de absorción exhibido a 260 nm por la muestra L83-6H6 al ser fraccionada sobre un gradiente lineal del 5 al 20% de sacarosa y distribución de la actividad IFN a través de él.

CONCLUSIONES

El método del tiocianato-cloruro de guanidinio se verifica como procedimiento efectivo para la obtención de ARN a partir de muestras de leucocitos.

La cromatografía del ARN total sobre Sephacryl 300 constituye un procedimiento rápido y reproducible para conocer de la integridad del material obtenido.

El fraccionamiento del ARN poli A sobre Sephacryl 500 resulta un procedimiento efectivo, rápido y reproducible para obtener preparaciones enriquecidas en ARNm de IFN con buena actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra gratitud a los ingenieros E. Novo y U. Pareta del CNIC por la construcción del equipo de inyección de oocitos.

REFERENCIAS

- BERGER, S. L.; D. M. WALLACE; G. P. SIEGAL; M. J. M. HITCHCOCK; C. S. BIRKENMEIER; y S. B. REBER (1981). *Preparation of Interferon Messenger RNAs with the Use of Ribonucleoside Vanadyl Complexes*. Meth. Enzym. **79** (B), 59-68, S. Pestka (ed.) Academic Press, New York.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H. L. KAUPPINEN y G. MYLLYLÄ (1981). *Production of Interferon in Human Leukocytes from Normal Donors with the use of Sendai Virus*. Meth. Enzym. **78** (A): 29-38, S. Pestka (ed.), Academic Press, New York.
- CHIRGWIN, I. M.; A. E. PRZYBYLA; R. J. MacDONALD y W. I. RUTTER (1979). *Isolation of Biologically Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease*. Biochemistry **18**, 5294-5299.
- GRAY, P. W.; D. W. LEUNG; D. PENNICA; E. YELVERTON; R. NAJARIAN; CH. C. SIMONSEN; R. DERYNCK; P. J. SHERWOOD; D. M. WALLACE; S. L. BERGER; A. D. LEVINSON y D. V. GOEDDEL (1982). *Expression of human immune interferon cDNA in E. coli and monkey cells*. Nature, **295**: 503-508.
- HOLLAND, L. J. y L. J. WANGH (1983). *Efficient recovery of functionally intact mRNA from agarose gels via transfer to an ion-exchange*. Nucl. Acids Res. **11**: 3283-3300.
- LEHRACH, H.; D. DIAMOND; I. M. WUZNEY; H. BOEDTKER (1977). *RNA Molecular Weight Determinations by Gel Electrophoresis Under Denaturing Conditions, a Critical Reexamination*. Biochemistry **16**: 4743-4751.
- MAEDA, S.; R. Mc CANDLISS; M. GROSS; A. SLOMA; PH. C. FAMILLETI; J. M. TABOR; M. EVINGER; W. P. LEVI y S. PESTKA (1980). *Construction and Identification of Bacterial Plasmids containing Nucleotide Sequence for Human Leukocyte Interferon*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 7010-7013.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 202-203. Cold Spring Harbor Lab.
- Mc CANDLISS, R.; A. SLOMA y S. PESTKA (1981). *Isolation and Cell-Free Translation of Human Interferon mRNA from Fibroblasts and Leukocytes*. Meth. Enzym. **79** (B): 51-59.
- NAGATA, S.; H. TAIRA; A. HALL; L. JOHNSRUD; M. STREULI; J. ECSÖDI; W. BOLL; K. CANTELL y CH. WEISSMANN (1980). *Synthesis in E. coli of a Polypeptide with Human Leukocyte Interferon Activity*. Nature **284**: 316-320.