Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 80-86 (1990)

Amplificación del gen de la ADN polimerasa I por multiplicación del λ polA mediante ciclo lítico en la E. coli WK6. Obtención y purificación de la enzima

R. G. MANRESA, A. M. RIVERÓN, D. HIGGINSON y J. L. REMIGIO

Laboratorio de Neurogenética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, La Habana, Cuba

Recibido en abril de 1989
Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

El fago λ polA (Qam73, Sam7) fue aislado y purificado de un lisógeno de la *E. coli* 594, y posteriormente se multiplicó en una cepa SupE, SupF. Se obtuvo una cantidad considerable de DNA polimerasa I multiplicándolo por vía ciclo lítico, tras la infección a alto MOI (Multiplicity of Infection) de una cepa libre de supresores amber (*E. coli* WK6). En este trabajo se muestran los resultados de la estandarización de las condiciones para obtener un nivel adecuado de expresión del gen polA, el esquema de purificación utilizado y se discuten las modificaciones realizadas para la obtención de la DNA polimerasa I a gran escala. La DNA pol I purificada incorporó P32-dATP por *Nick translation* en fragmentos de DNA entre 800-50 000 bp con un alto marcaje específico.

SUMMARY

Phage λ pol A (Qan 73, Sam 7) was isolated and purified from a culture of the strain of *E. coli* k594 that contained it in an integrative form. Because of the fact that λ pol A (which contains the gene of DNA pol I) has amber mutations in the genes of lysis, the phage was multiplied in a Sup E, Sup F strain (LE 392). A considerable amount of the enzime was obtained infecting with the phage a strain (WK6) free of supressors of amber mutations thus provoking intracellular accumulation. Purified DNA pol I incorporated P32-dATP by Nick traslation in DNA fragments 800-50.000 bp with a high specific labelling.

INTRODUCCION

Los reportes de la literatura coinciden en que la amplificación del gen de la DNA polimerasa I, cuando se multiplica mediante ciclo lítico el fago λ polA tras una infección a alto MOI, es mayor que la obtenida por inducción térmica de los lisógenos correspondientes (Murray *et al.*, 1979). También se reporta que algunos lisógenos, por ejemplo los lisógenos del λ polA NM961, brindan un nivel de amplificación del gen polA comparable al que se obtiene mediante el ciclo lítico del λ polA NM857 (Murray *et al.*, 1979). Estos hechos indican que tanto por inducción del lisógeno, como por infección a alto MOI, es posible obtener cantidades considerables de enzima (Murray *et al.*, 1979). Sin embargo, si se desea obtener la enzima en grandes cantidades debe tomarse en consideración que a pesar de que la inducción del lisógeno requiere menos manipulaciones, el ciclo lítico es consistentemente más productivo.

Como es conocido, el fago transduciente λ polA (NM 857) contiene el gen de la DNA polimerasa I de *E. coli* clonado bajo

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

el promotor del PL, y es poseedor de la mutación termosensible cI857 y de mutaciones *amber* en los genes Q y S. La mutación termosensible determina que la inducción térmica del lisógeno provoque síntesis del bacteriófago y de la enzima, mientras que las mutaciones *amber* en los genes Q y S determinan que se libere al medio de cultivo, o se acumule intracelularmente, tanto la enzima como el fago según el hospedero posea o no supresores de mutaciones *amber* (Murray *et al.*, 1979 y Kelley *et al.*, 1977).

Lo enunciado anteriormente señala el ciclo lítico como la vía más productiva de obtención de la DNA polimerasa I, y la infección de un hospedero libre de supresores *amber* como medio para lograr la acumulación intracelular de la enzima.

En este trabajo se muestran los resultados de la estandarización de las condiciones para obtener un nivel adecuado de expresión del gen polA por multiplicación del λ polA en la *E. coli* WK6 (libre de supresores de *amber*) mediante ciclo lítico, así como el esquema de purificación utilizado, y se discuten las modificaciones realizadas para la obtención de la DNA polimerasa I a gran escala.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de *E. coli* y el fago utilizados para la infección se describen en la tabla 1; los medios y los métodos microbiológicos generales utilizados, así como la titulación del fago, son similares a lo descrito en Maniatis *et al.*, 1982.

Método de aislamiento y purificación del fago λ polA

Se realizó la inducción térmica del lisógeno del λ polA de la *E. coli* 594 y posteriormente se precipitaron las partículas de fago con PEG-6000 al 10% de concentración final. El precipitado que contiene las partículas de fago se centrifugó a 3 000 rpm, 15 min y se resuspendió en buffer de fago (Maniatis *et al.*, 1982). Tras la extracción con cloroformo se recuperó la fase acuosa que contiene las partículas de fago y se multiplicó en la cepa de *E. coli* LE 392 por ciclo lítico hasta alcanzar un título de 10E10 fagos/ml. Se realizaron, además, diferentes ensayos en *E. coli* LE 392 y en la WK6 para determinar el MOI óptimo que va a infectar la cepa de *E. coli* WK6 (ver tabla 2), siguiéndose la cinética de incorporación de P32-dATP en DNA de timo en ambas cepas (ver figura 1).

Tabla 1
GENOTIPO DEL FAGO λ polA Y DE LAS CEPAS DE *E. COLI*

Fago	Genotipo	Fuente
NM 857	λ polA^{1} att^{+} red^{+} imm$^{\lambda}$ cI857 nin5 Qam73 Sam7	Murray *et al.* (1979)
Cepa	**Genotipo**	**Fuente**
594	Libres de supresores, λ^{s}	Weigle (1966)
LE 392	lacY galT metB trpR SupE SupE hsdR	Joyce *et al.* (1985)
WK6	lacI^{q} galE strA proA^{+} B^{+}ΔM15	Stanssens *et al.* (1986)

Método de obtención de la DNA polimerasa I (Kelley *et al.*)

Se siguió fundamentalmente el esquema propuesto por Kelley *et al.*, 1979. La *E. coli* WK6 se infectó con el λ polA al MOI seleccionado y se creció en un litro de LB a 37°C, con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,9 a 1 (8 x 10E8 cel/ml). Las células fueron colectadas por centrifugación a 4°C 10 000 g, 10 min. Los 4 gramos de célula húmeda obtenida fueron resuspendidos en Tris 50 mM, pH 7,6, dithiothreitol 1 mM y lisadas alternando 1 min de sonicación y 1 min de reposo durante 20 min a 0°C. El debris celular fue eliminado por centrifugación a 10 000 g 10 min, al sobrenadante se le añadió la cantidad suficiente de polimina P al 10%, pH 7,6 para alcanzar una concentración final de 0,9% y se centrifugó a 15 000 g 10 min en frío. El pellet fue disuelto en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 6,5 EDTA 2 mM, dithiothreitol 1 mM y sulfato de amonio 0,2 M, centrifugado a 15 000 g 10 min y resuspendido en el mismo buffer.

Se realizó un primer fraccionamiento salino con sulfato de amonio a 40% de saturación y el pellet de la centrifugación a 15 000 g, 15 min, fue desechado. El sobrenadante se llevó a 85% de saturación con sulfato de amonio. Esta suspensión permaneció en reposo toda la noche a 4°C, siendo colectado el precipitado por centrifugación a 15 000 g, 15 min.

El precipitado obtenido con sulfato de amonio fue disuelto en fosfato de potasio 200 mM, pH 6,5, mercaptoetanol 10 mM y pasado por una columna de DEAE celulosa (ver figura 2), colectándose aquellas fracciones cuya absorbancia 280/260 fueran mayor que la unidad, posteriormente fueron reprecipitadas con sulfato de amonio a una concentración final de 85% de saturación.

Este precipitado fue disuelto en fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5, mercaptoetanol 10 mM y el sulfato de amonio residual fue eliminado por filtración en gel (Sephadex G-25) equilibrada previamente con fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5 y mercaptoetanol 10 mM.

La solución obtenida fue sometida a cromatografía de intercambio catiónico a través de una columna de fosfocelulosa (ver figura 3), con un gradiente de buffer fosfato 20 a 1 000 mM, pH 6,5 y mercaptoetanol 10 mM.

La determinación de la actividad de la DNA polimerasa I se efectuó según Kelley *et al.* (1977, 1979) monitoreando la reacción de incorporación del nucleótido marcado (P32-dATP) en DNA de timo de ternera altamente polimerizado.

Las fracciones con actividad DNA polimerásica fueron reunidas y concentradas contra fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0 y glicerol al 70% toda la noche en frío.

RESULTADOS Y DISCUSION

En este trabajo se muestran las condiciones óptimas de multiplicación del fago λ polA en la cepa de *E. coli* WK6 y los resultados obtenidos al purificar la enzima por el método desarrollado por Kelley *et al.*, 1979, el cual, según ha sido reportado, es útil para obtener cantidades considerables de enzima en breve tiempo.

En la tabla 2 se muestran los títulos del fago en la cepa de *E. coli* LE 392, obtenidos a diferentes MOI y la actividad DNA polimerasa I asociada. El título mayor del fago y la actividad de la enzima asociada se obtuvo para un valor de MOI de 10E8/10E12, el cual resultó considerablemente mayor que el reportado en la literatura de 15-20 fagos/célula (Murray *et al.*, 1979 y Kelley *et al.*, 1979).

Tabla 2

TITULACION DEL FAGO λ polA EN LA CEPA DE *E. COLI* LE 392 Y ACTIVIDAD DNA POLIMERASA I POSTERIOR A LA LISIS CELULAR

MOI (cel/fago)	Título (fago/ml)	Incorporación de P32-dATP en DNA de timo (CPM)
$10^8/10^3$	$1{,}0 \times 10^5$	$8{,}0 \times 10^3$
$10^8/10^5$	$1{,}0 \times 10^7$	$1{,}6 \times 10^4$
$10^8/10^7$	$1{,}0 \times 10^{12}$	$3{,}3 \times 10^5$
$10^8/10^{12}$	$1{,}0 \times 10^{14}$	$3{,}0 \times 10^8$

Este valor óptimo de MOI fue seleccionado para infectar la *E. coli* WK6 y verificar si los niveles de expresión del gen polA en esta cepa eran comparables con los obtenidos en la LE 392. La cinética de acumulación de la enzima durante el crecimiento en las dos cepas de *E. coli* (figura 1) infectadas con el fago λ polA, mostró que la actividad de la DNA polimerasa I es similar en ambas cepas, por lo que concluimos que es posible obtener la enzima en la cepa de *E. coli* WK6, ya que el nivel de expresión de la DNA polimerasa I en esta cepa es similar al que se logra en la cepa de *E. coli* LE 392, con la ventaja de que la cepa libre de supresores no vierte la enzima al medio de cultivo, hecho útil para su obtención a gran escala.

En las diferentes etapas de purificación de la DNA polimerasa I se colectaron fracciones que fueron sometidas a ensayo, cuantificándose su actividad polimerizante en DNA de timo. Los resultados obtenidos muestran un incremento de la purificación de 2307 en fosfocelulosa con respecto al extracto celular, dado por la relación CPM/DO 280, hecho que demuestra un aumento de la pureza de las preparaciones en la medida en que transcurre la extracción de la enzima (tabla 3).

En la figura 2 puede observarse que la enzima DNA polimerasa I, eluye de la cromatografía en DEAE celulosa en las fracciones correspondientes al lavado de la columna, mientras por el contrario, en la columna de intercambio catiónico (fosfocelulosa), la enzima eluye dentro del rango de gradiente de concentración entre 200 y 600 mM de buffer fosfato (figura 3).

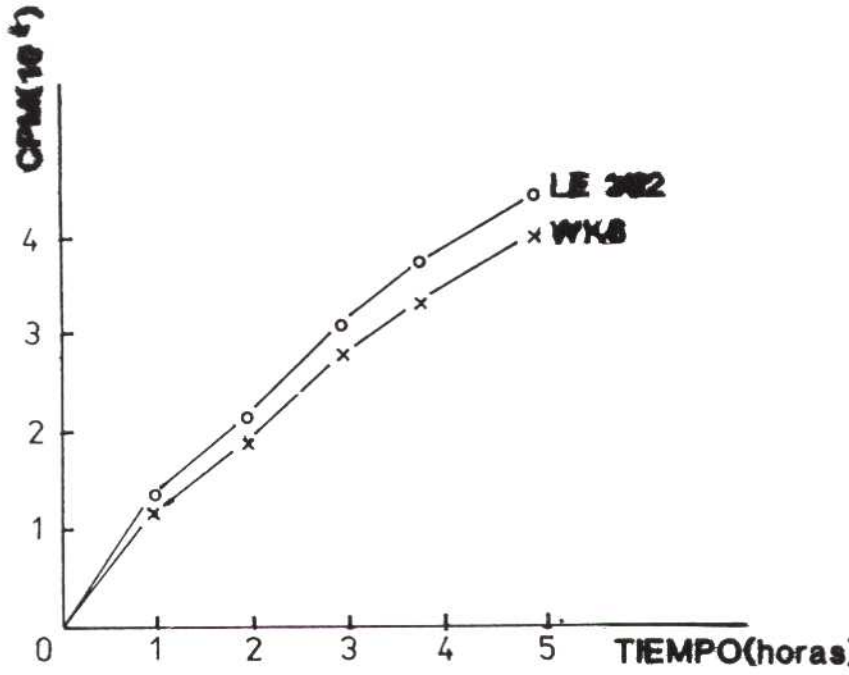

FIG. 1. Actividad de la DNA polimerasa I en dos cepas de *E. coli*, la LE 392 y la WK6.

Tabla 3
ETAPAS DE PURIFICACION DE LA DNA POLIMERASA I

Pasos de purificación	DO 280/ml	CPM/ml	CPM/DO280	Purificación
Extracto celular	20,3	$2,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	1
Sulfato de Amonio	9,52	$1,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	10,8
DEAE celulosa	4,99	$3,9 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$	60
Fosfocelulosa	0,12	$3,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$	2307

CPM: Cuentas por minuto de la incorporación de P32-dATP en DNA de timo de ternera.

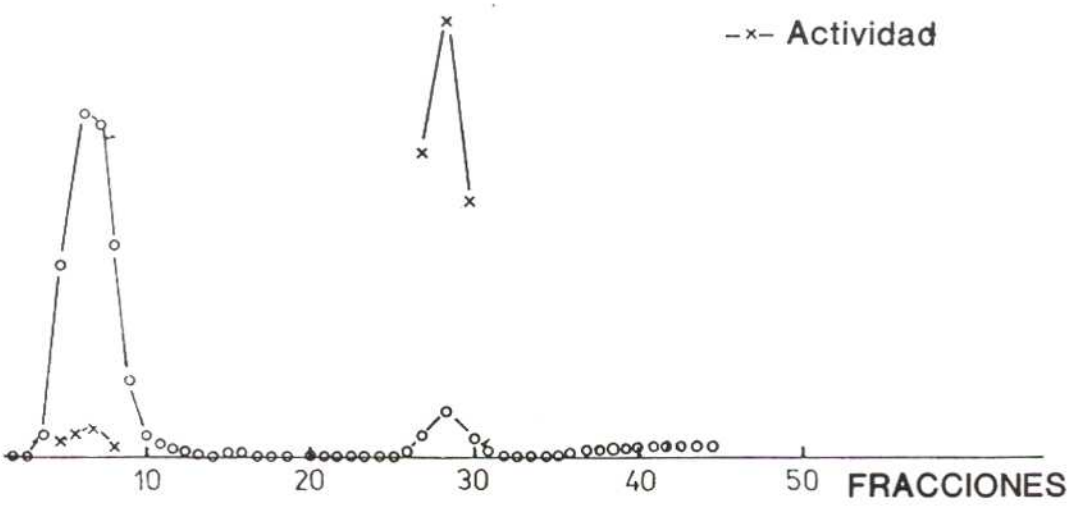

FIG. 2. Cromatografía en DEAE celulosa (5 cm de diámetro x 7 cm) preequilibrada en buffer fosfato 200 mM, pH 6,5. β-mercaptoetanol 10 mM. Se colectaron fracciones de 2,5 ml.

Consistentemente en nuestro trabajo, las características de elución de la enzima durante la cromatografía en fosfocelulosa difieren de lo reportado por Kelley *et al.*, 1979, el cual obtuvo que la enzima eluye dentro del rango comprendido entre 75 y 150 mM. Estos autores reportan que posterior a la cromatografía en fosfocelulosa, la enzima está pura según los resultados obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida, sin embargo, posee cantidades variables de un pigmento amarillo el cual es probablemente resultado de la precipitación con Polymina P. Para eliminar el pigmento realizaban una cromatografía en Bio-Gel P-150.

En nuestro caso, las fracciones con actividad de DNA polimerasa I, colectadas posterior a la cromatografía en fosfocelulosa, no presentaban contaminación con el pigmento amarillo, por lo que no se realizó la cromatografía en Bio-Gel P-150. Como dato de interés del proceso de obtención es de señalar que la enzima es muy inestable

durante el proceso de extracción y purificación, por lo que requiere que el proceso sea efectuado ininterrumpidamente. Según Kelley *et al.*, 1979 este método de purificación brinda la enzima DNA polimerasa I esencialmente libre de contaminación con endonucleasas, pero presenta trazas de proteasas, las cuales pueden causar gradual degradación, rindiendo grandes fragmentos y retardo en su actividad polimerizante.

En nuestro caso no parece existir esta contaminación, pues en 5 meses de conservación la enzima no ha perdido actividad polimerizante. Sin embargo, hemos verificado que la enzima obtenida presenta trazas de DNAasa, lo que motiva que pueda efectuarse el marcaje por *nick translation* sin necesidad de añadir DNAasa a la reacción. A pesar de poder efectuar el marcaje sin necesidad de añadir DNAasa, lo que parecería una ventaja, esta contaminación no es deseable pues requiere que en cada lote de extracción sea determinada la cantidad de DNAasa contaminante o las condiciones de *nick translation* de dicho lote.

La DNA polimerasa I obtenida fue testada mediante la reacción de *nick translation* descrita por Rigby *et al.*, 1977.

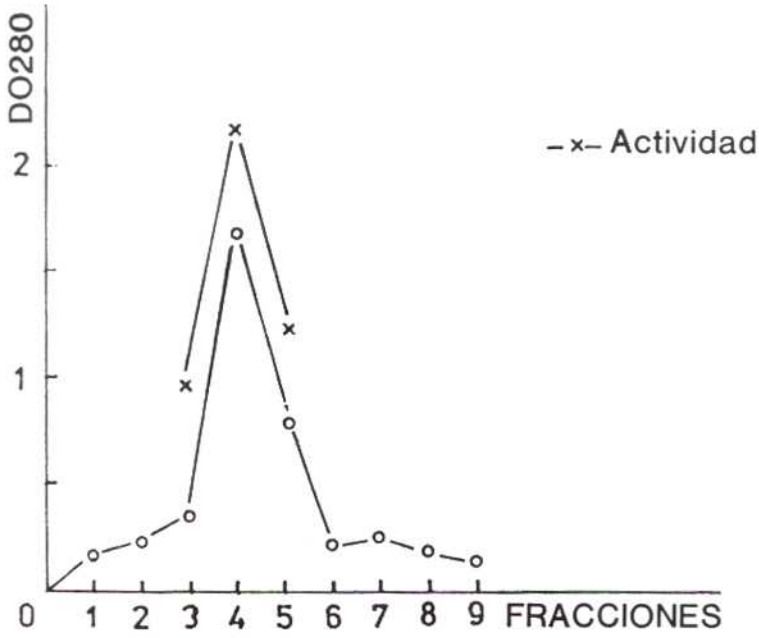

FIG. 3. Cromatografía en fosfocelulosa (1,2 cm de diámetro x 6 cm) previamente equilibrada con buffer fosfato 10 mM, pH 6,5. β-mercaptoetanol 10 mM. Se colectaron fracciones de 1,7 ml.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4, los que indican que la enzima obtenida puede ser utilizada no solo en marcaje de moléculas de DNA de la talla del fago λ y plasmidios, sino también en el marcaje de fragmentos de 800 bp (pares de bases), ya que no se aprecia diferencia al compararla con la enzima de la firma comercial Boehringer Mannheim Biochemical (10 U/μl). Coincidiendo con los resultados de Kelley *et al.*, 1979, la enzima obtenida resultó muy efectiva en el marcaje de DNA.

Tabla 4
INCORPORACION DE P32-dATP EN DNA DE DIFERENTES TALLAS CON LA ENZIMA BOEHRINGER MANNHEIN BIOCHEMICA Y DE LA OBTENIDA EN EL LABORATORIO

DNA	Talla kb	CPM/μg	
		Enzima Boehringer 10 U/μl	Enzima del laboratorio 1 μl
λ	48,5	$2,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
YIp5 plasmidio	5,5	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
Apo A1 cDNA	0,8	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

REFERENCIAS

JOYCE, C. M.; D. M. FUJII; H. S. LAKS; C. M. HUGHES y N. D. GRINDLEY (1985). *Genetic mapping and DNA sequence analysis of mutations in the polA gene of* Escherichia coli. J. Mol. Biol., **186**: 283-293.

KELLEY, W. S.; K. CHARMERS y N. E. MURRAY (1977). *Isolation and characterization of a λ polA transducing phages*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5632-5636.

KELLEY, W. S. y K. H. STUMP (1979). *A rapid procedure for isolation and large quantities of* Escherichia coli *DNA polimerase I utilizing a λ polA transducing phage*. The Journal of Biological Chemistry **254**: 3206-3210.

MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

MURRAY, N. E. y N. W. MURRAY (1979). *Characterization of λ polA transducing phages: Effective expression of the* E. coli *polA*. Gene. Molec. Gen. Genet. **175**: 77-87.

RIGBY, P. W. J.; M. DIECKMANN; C. RHODES y P. BERG (1977). *Labeling deoxiribonucleic acid to high specific activity* in vitro *by Nick translation with DNA polimerase I*. J. Mol. Biol. **113**: 237-251.

STANSSENS, P.; Y. MCKEOWN; K. FRIEDRICH y H. J. FRITZ (1986). *Oligonucleotide directed construction of mutations by the gapped duplex DNA method using the pua/c plasmid vectors plant genetic System*. J. Plateaustraat **22**: B-900 Gent Belgium.

WEIGLE, J. (1966). *Assembly of phage lambda* in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **55**: 1462-1466.