

Optimización de las condiciones de purificación de T4 ADN ligasa

N. CARBALLEIRA y L. HERRERA

Laboratorio de Enzimas de Restricción y Modificación del ADN, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en enero de 1990

Aprobado en enero de 1990

RESUMEN

El procedimiento reportado por Davis *et al.*, 1980, para purificar T4 ADN ligasa, ha sido modificado con el objetivo de obtener una preparación de la enzima virtualmente libre de exonucleasas. Se modificaron las condiciones de elución de las columnas de P11 e hidroxilapatita: en vez de eluir en un paso, en ambas se aplicó un gradiente lineal, de 300 a 800 mM de cloruro de sodio en la columna de P11 y de 0 a 800 mM en la de hidroxilapatita. Este procedimiento permitió la eliminación de nucleasas y la obtención de una preparación enzimática de gran calidad.

SUMMARY

The procedure reported by Davis *et al.*, 1980, for the purification of T4 DNA Ligase has been modified in order to obtain an enzymatic preparation virtually free of exonucleases. The elution conditions for the P11 and hydroxylapatite columns were modified. Instead of one elution step in both columns, a linear gradient was applied, from 300 to 800 mM sodium chloride in P11 and from 0 to 800 mM ammonium sulfate in hydroxylapatite. By this procedure the nuclease activity was removed and a high quality enzymatic preparation was obtained.

INTRODUCCION

Es conocido el importante rol que desempeñan las ADN ligasas en los procesos celulares de replicación y reparación del material genético. El empleo tan difundido de la T4 ADN

ligasa en los laboratorios que se ocupan de la manipulación *in vitro* del ADN, permite que sea considerada como una enzima clave en todos los trabajos de clonación, por lo cual se requieren preparaciones de gran pureza y buena actividad.

La purificación de esta enzima fue descrita originalmente por Weiss y Richardson, partiendo de células infectadas por el fago T4 tipo salvaje (Weiss y Richardson, 1967; Weiss *et al.*, 1968).

Además, se ha reportado la obtención de T4 ADN ligasa a partir de mutantes de fagos defectivos en la replicación del ADN (Panet *et al.*; Knopf, 1977). También se ha obtenido de lisógenos de lambda en *E. coli* portadores del gen de la enzima (Davis *et al.*, 1980; Murray *et al.*, 1979; Wilson y Murray, 1979).

Al seguir los procedimientos descritos para la purificación de la enzima, las preparaciones obtenidas en nuestro laboratorio no resultaron totalmente libres de nucleasas, por lo que se emprendió un trabajo de optimización de las condiciones de purificación a partir de un lisógeno de lambda similar al descrito por Davis *et al.*, 1980.

En este trabajo describimos el conjunto de modificaciones que permitieron obtener

preparaciones de T4 ADN ligasa virtualmente libres de nucleasas.

MATERIALES Y METODOS

Cepa

La enzima fue obtenida de las cepas *E. coli* E1150 cI Sam 7 lisógeno (Davis *et al.*, 1980) y *E. coli* que contenía el gen de la T4 ADN ligasa insertado en un plasmidio bajo el control del promotor PL (*E. coli* X).

Medios de cultivo

El medio empleado fue extracto de levadura 5 g/l; triptona 10 g/l y cloruro de sodio 10 g/l.

Resinas usadas

La DEAE 52 y la fosfocelulosa (P11) procedían de Whatman (Inglaterra) y la hidroxilapatita de BioRad (EE.UU.). En el HPLC para la filtración en gel se empleó una columna TSK 3000 SW 7,5; 600 mm (Toyo Soda, Japón) y para la hidroxilapatita se usó una columna de 6 X 300 mm (Koken, Japón).

La agarosa y la lisozima empleadas provenían de Sigma LTD y el resto de los reactivos de Merck, BDH y Fluka.

Las columnas y sus accesorios procedían de Pharmacia, Suecia.

ADNs

El ADN de fago lambda fue obtenido a partir de *E. coli* CSH 45 Cold Spring Harbor Collection, EE.UU., usando el método de Silhavy *et al.*, 1984.

El pBR322 y el pUC19 fueron purificados de acuerdo con el procedimiento de Birnboim y Doly, 1978.

La BSA libre de nucleasas así como las enzimas de restricción usadas procedían de Enzibiot, Cuba, y fueron empleadas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Condiciones de crecimiento

Las células se crecieron en zaranda a 28°C. Cuando el cultivo alcanzó la DO₆₀₀ = 0,6 se indujo a 42°C en baño termostático y se dejó incubando 3 horas en zaranda.

También se hicieron ensayos en fermentadores Bioengineering Marubishi LTD., Japón, de 5 l de volumen de trabajo.

Purificación de la enzima

La purificación se realizó siguiendo el procedimiento de Davis *et al.*, 1980, en lo fundamental, que consiste en:

Preparación del extracto enzimático

Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis conteniendo sulfato de amonio al 5 % de saturación, espermidina 20 mM, EDTA 20 mM, 2-Mercaptoetanol 5 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y sacarosa 0,15 g/ml.

Se añadió lisozima a 0,5 mg/ml, se incubó 30 minutos en hielo y 5 minutos a 37 °C. Se centrifugó a 37 000 rpm 1 hora, a 4 °C en el rotor RPS-70T, Hitachi, Japón. El extracto crudo fue precipitado con sulfato de amonio al 55 % de saturación.

Procedimientos cromatográficos

El precipitado de sulfato de amonio se resuspendió en buffer A que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 7,2), 2-Mercaptoetanol 5 mM y NaCl 300 mM.

Se aplicó a una columna de DEAE-52 equilibrada con ese mismo buffer; la enzima eluyó en el pase a través de la resina. Se realizó una diálisis contra buffer A sin NaCl y se aplicó a una columna de fosfocelulosa (P11) activada por el método de Greene *et al.*, 1978, y equilibrada con buffer A sin NaCl. Los lavados y la elución sufrieron modificaciones del protocolo original que aparecen recogidas en el epígrafe de Resultados.

Las fracciones obtenidas de la columna anterior se desalinizaron por diálisis contra buffer A para ser aplicadas sobre una DEAE-52, esta vez equilibrada con buffer A sin NaCl. Se eluyó de la forma descrita por Davis *et al.*, 1980, y las fracciones recolectadas fueron aplicadas en hidroxilapatita. A esta última columna también se le realizaron modificaciones y los resultados se presentan más adelante.

Finalmente, se concentraron las muestras con polietilenglicol 35 000 y se sometieron a diálisis contra el siguiente buffer: KCl 50 mM, DTT 1 mM, Tri-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, BSA 500 µg/ml y glicerol al 50 %.

Ensayos enzimáticos

Ensayo de actividad

Para detectar la actividad de la T4 ADN ligasa, en cada etapa de la purificación se realizó el ensayo de unidades similar a lo reportado en el catálogo *New England Biolabs* (1986/1987), usando como sustrato 1 µg de ADN de fago lambda digerido con la restrictasa Hind III en presencia del buffer de ensayo de la T4 ADN ligasa y en 20 µl de reacción a 15 °C durante 30 minutos. Se aplicó en gel de agarosa 0,6 % tris acetato (0,15 unidades de la enzima son capaces de ligar el 50 % de ADN en las condiciones descritas anteriormente).

Ensayo de endonucleasas

La presencia de endonucleasas se valora por el grado de conversión del ADN de forma I a forma II;

para esto, diferentes cantidades de la preparación fueron incubadas con 1 μ g de pUC19 durante 16 horas, a 15 °C en 20 μ l de reacción, y fueron analizadas en gel de agarosa 0,8% tris borato.

Ensayo de exonucleasas

En los pasos intermedios de la purificación estos ensayos se realizaron incubando las fracciones activas con 1 μ g de ADN de fago lambda digerido con la restrictasa Hind III durante 16 horas, a 15 °C en 20 μ l de reacción y en ausencia de ATP. En la preparación de la enzima pura se ensayó con 1 μ g de pBR322 digerido con la enzima de restricción Taq I. El mantenimiento del patrón de restricción normal visualizado en geles de agarosa de 0,6 % o 1,2% tris acetato (según el sustrato), indica la ausencia de exonucleasas.

Pureza de la enzima

Se verificó la pureza de la enzima mediante una electroforesis en gel poliacrilamida al 12,5 % (Laemli, 1970).

RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad enzimática fue 6,6 veces mayor en el cultivo en zaranda con respecto al fermentador (ver tabla 1), lo que determinó el uso de la primera como forma de cultivo.

Tabla 1
COMPARACION DEL RENDIMIENTO EN ZARANDA Y FERMENTADOR

Condiciones de multiplicación	Zaranda	Fermentador
Rendimiento de biomasa por litro de cultivo	4 g	1 g
Unidades de enzima por litro de cultivo	100 000	15 000

Eficiencia de ligazón de extremos romos

Esta se determinó en gel de agarosa 1,2 % tris acetato, valorando la cantidad de enzima necesaria para lograr la ligazón del 50 % de ADN de fago lambda (1 μ g) digerido con la restrictasa Alu I a 15 °C durante una hora.

Ensayo funcional

La capacidad de la enzima para ligar los extremos protuberantes está dada por la frecuencia de transformación (f = número de colonias/ μ g de ADN) en la ligazón con respecto a la frecuencia del nativo. Para evaluar esto, 120 ng de pBR322 digerido con 1.2 unidades de la restrictasa Cla I, durante 1 hora a 37 °C fueron ligados con 400 unidades de la preparación enzimática y tanto el ADN digerido como el ligado, fueron transformados en *E. coli* MC1066.

Para la purificación se prepararon 20 l de cultivo que dieron lugar a 54 g de células de la cepa *E. coli* E1150, y en el caso de la cepa *E. coli* X, se hicieron 5 l que rindieron 17 g, siendo procesados como es descrito en *Materiales y Métodos*.

En el primer intento de purificación efectuado aplicando el procedimiento de Davis *et al.* (1980) a la cepa *E. coli* E1150, no se consiguió llegar a una preparación libre de nucleasas. Con la muestra obtenida de esta purificación, se realizaron diferentes ensayos en columnas de HPLC por filtración en gel, DEAE e hidroxilapatita, para tratar de eliminar las

nucleasas, y aunque la recuperación de la actividad fue del 90 %, este objetivo no fue logrado (datos no mostrados). Fue necesario emprender un segundo proceso de purificación partiendo de la misma cepa y realizarle modificaciones al protocolo de Davis *et al.* 1980, las cuales se describen a continuación.

La columna de P11 se sometió a lavados con 150 y 300 mM de NaCl en el buffer A y se pudo determinar que la enzima no aparecía en los lavados, sin embargo, estos contenían proteínas, por lo que se decidió lavar extensivamente a 300 mM de NaCl. En vez de proceder a la elución en un paso según Davis *et al.* (1980), realizamos un gradiente lineal de 300 a 800 mM de NaCl en buffer A. En las fracciones obtenidas se detectó que si bien un grupo tenía un alto valor de actividad enzimática, también mostraban gran contenido de exonucleasas, ya que el ADN expuesto durante 16 horas, en muchas de ellas desaparecía o era degradado totalmente. Así se logró eliminar una proporción elevada de nucleasas que según el procedimiento de Davis *et al.* (1980), quedaban incluidas en la preparación.

La segunda columna de DEAE se realizó según lo descrito por Davis *et al.*, 1980, pero ella no parece aportar elementos sustanciales en la purificación (tabla 2).

Los eluatos de DEAE fueron aplicados sobre hidroxilapatita. Esta columna fue lavada extensivamente con buffer A.

Se realizaron dos tipos de ensayos, uno de ellos consistente en lavados a diferentes concentraciones de K_3PO_4 ; en esta ocasión la actividad se encontró en un gran número de fracciones y no logró la eliminación completa de las nucleasas.

En el segundo ensayo, el lavado se realizó con buffer A pero en vez de efectuar la elución en un solo paso a 500 mM de sulfato de amonio, se aplicó un gradiente de dicha sal entre 0 y 800 mM. De esta forma se lograron fracciones con actividad de ligasa, las cuales no mostraban presencia de nucleasas.

En las tablas 2 y 3 puede apreciarse que la primera columna de DEAE y la P11 son las que introducen los mayores niveles de purificación, estando el punto crítico, según nuestro criterio, a nivel de la P11, que es donde se tiene que tratar de eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes.

Tabla 2
CUADRO RESUMEN DE LA PURIFICACION PARTIENDO DE LA CEPA LISOGENA

Etapas	Proteínas totales (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (U/mg)
Crudo	2 220	2 000 000	900
DEAE	120	1 900 000	15 833
P11	52	1 850 000	35 576
DEAE	30,4	1 800 000	59 210
Hidroxilapatita	8,8	1 760 000	200 000

Sin embargo, solamente el manejo bien controlado de la columna de hidroxilapatita permitió la virtual eliminación de las nucleasas.

Una vez modificado el protocolo, fue aplicado en una purificación de la enzima, esta vez partiendo de la cepa *E. coli* X. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Resulta también evidente que este sistema de expresión alcanza niveles muy superiores al del lisógeno. En la figura 1 se muestra el ensayo de actividad de esta preparación: hasta la dilución 1/2000 se logra más del 50 % de ligazón del material, no ocurriendo así en diluciones subsiguientes de la enzima.

Tabla 3
CUADRO RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN A PARTIR DE LA CEPA *E. COLI* X

Etapas	Proteínas totales (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (U/mg)
Crudo	8 096	20 000 000	2 400
DEAE	1 824	19 000 000	10 416
P11	120	15 000 000	125 000
DEAE	112	14 000 000	125 000
Hidroxilapatita	40	13 000 000	325 000

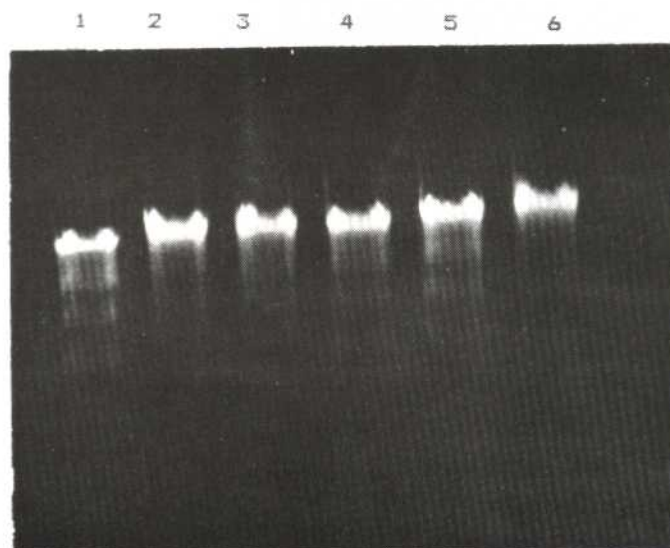


FIG. 1. Ensayo de actividad ligasa de la muestra obtenida en la purificación a partir de *E. coli* X. En la figura se muestra: 1) ADN de fago lambda digerido con la restrictasa Hind III y (2-6) incubado 30 minutos a 15°C con diluciones de la preparación enzimática: 1/400, 1/800, 1/1600, 1/2000, 1/1, respectivamente; en presencia de tris HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM, DTT 20 mM, ATP 1mM y BSA 50 µg/ml.

Se encontró que se necesitan de 200 a 400 unidades de T4 ADN ligasa para producir el 50 % de ligazón de los fragmentos del ADN de fago lambda digerido con Alu I (resultados no mostrados).

En el ensayo funcional se obtuvieron los resultados siguientes:

f nativo = $4,6 \times 10^5$ colonias / μg

f cortado = 10^2 colonias / μg

f religado fracción 1 = $4,5 \times 10^4$ colonias / μg

f religado fracción 2 = 4×10^4 colonias / μg

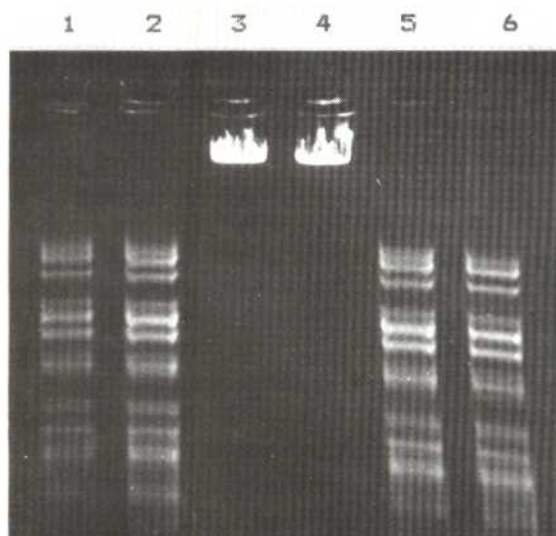


FIG. 2. Ensayo de ligazón de extremos romos de la preparación enzimática obtenida en la purificación a partir de la cepa *E. coli* X. Tres microgramos de ADN de fago lambda digerido con la restrictasa Alu I; (líneas 1 y 2) y el material digerido se ligó con 400 U de T4 ADN ligasa durante 8 horas a 15 °C (líneas 3 y 4) en solución T4-PEG (tris HCl 50 mM, pH 7,8; MgCL₂ 5 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 16 %); 2 μg de la ligazón fueron nuevamente digeridos con la restrictasa Alu I (líneas 5 y 6), para chequear la ausencia de nucleasas en la preparación de t4 ADN ligasa. El ADN de fago lambda fue inicialmente digerido con 22 U/ μg líneas 1, 3 y 5) o 5 U/ μg (líneas 2, 4 y 6) de restrictasa Alu I.

Se chequeó, además, por un ensayo de ligazón de extremos romos, que la enzima produce 100% de ligazón de fragmentos de ADN de fago lambda sobredigeridos con la restrictasa Alu I, sin modificar los extremos (figura 2).

En la incubación de pUC19 con la preparación, se aprecia la conversión de menos del 5 % de la forma I del ADN a forma II, lo que indica la ausencia de endonucleasas (datos no mostrados). En el ensayo de exonucleasas se mantuvo el patrón normal de restricción, lo que indica que estas fueron eliminadas. (Ver figura 3.)

f religado T4 ligasa control = $4,8 \times 10^4$ colonias / μg

Cumpléndose que:

f cortado $\leq 10^{-3}$ f nativo

f religado $\geq 2 \times 10^{-1}$ f nativo (figura 4)

En la figura 5 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida, mediante la cual se pudo verificar la pureza del material obtenido en la purificación partiendo de la cepa *E. coli* X.

Esta preparación ha sido empleada en trabajos con linkers y en el acoplamiento de oligonucleótidos para la fabricación de fragmentos mayores de ADN por vía sintética con resultados satisfactorios.

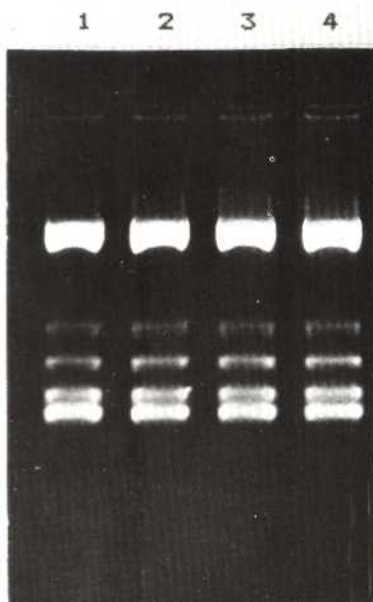


FIG. 3. Ensayo de exonucleasas de la preparación de T4 ADN ligasa obtenida partiendo de *E. coli* X. Un microgramo de plasmidio pBR322 digerido con la restrictasa Taq I fue incubado durante 16 horas a 15°C con diferentes cantidades de la preparación enzimática en presencia del buffer descrito en la figura 1, pero sin ATP. Línea 1) pBR322 digerido con la restrictasa Taq I; (líneas 2- 4) incubado con 60, 100 y 200 unidades de la preparación, respectivamente.

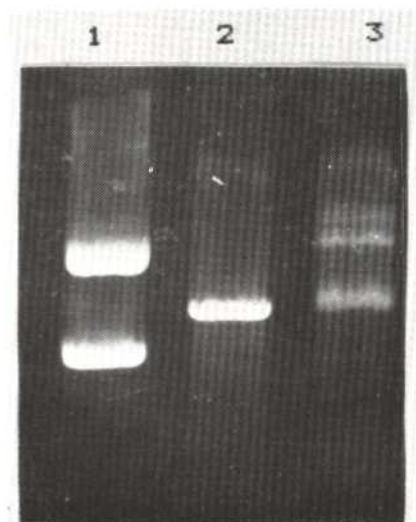


FIG. 4. Ensayo funcional de la preparación enzimática obtenida a partir de *E. coli* X. Ciento veinte nanogramos de plasmidio pBR322 (línea 1) fueron digeridos con 10 U/ μ g de restrictasa Cla I (línea 2) e incubado por 16 horas a 15°C con 400 unidades de la preparación obtenida (línea 3).

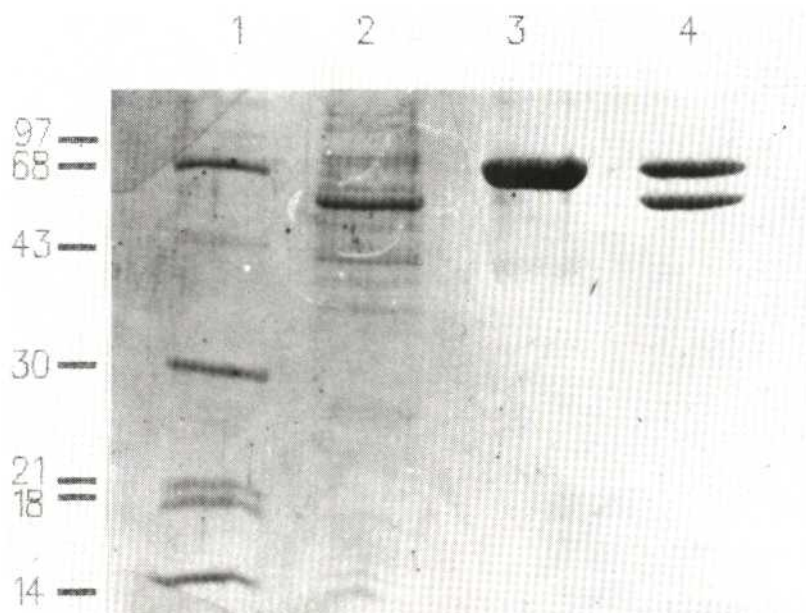


FIG. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Línea 1: Proteínas patrones de pesos moleculares (Fosforilasa B 97 kDa, BSA 68 kDa, ovoalbúmina 43 kDa y anhidrasa carbónica 30 kDa); Inhibidor de tripsina 21 kDa, beta lacto; 2) Extracto enzimático crudo; 3) BSA libre de nucleasas, que fue añadida a la preparación enzimática obtenida; 4) preparación enzimática obtenida a partir de *E. coli X*, conteniendo BSA libre de nucleasas.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Carlos Mella y José de la Fuente por sus valiosos consejos en la redacción del trabajo.

A los compañeros Aymeé Pérez, Ricardo Leonart y Adrián Suárez por su importante ayuda técnica.

REFERENCIAS

- BIRBOIM, H. C. y J. DOLY (1978). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acid Res. 7: 1513-1524.
Catálogo New England Biolabs (1986/87) :41.

DAVIS, R.W.; D. BOTSTEIN Y J. R. ROTH (1980). *Manual for Genetic Engineering Advanced Bacterial Genetics*. CSHL, USA: 196-197.

GREENE P. J.; H.L. HEYNEKER; F. BOLIVAR; R.L. RODRIGUEZ; M.C. BETTACH; A.A. COVARRUBIAS; K. BACKMAN; D.J. RUSSEL; R. TAIT y H.W. BOYER (1978). *A general method for the purification of restriction enzymes*. Nucl. Acid Res. 5: 2373-2380.

KNOPF, K. W. (1977). *Simple isolation method and assay for T4 DNA ligase and characterization of the purified enzyme*. Eur.Journal Biochem. 73: 33-38.

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

MURRAY, N.E.; S.A. BRUCE Y K. MURRAY (1979). *Molecular cloning of the DNA ligase from bacteriophage T4. Amplification and preparation of the gene product*. J.Mol. Biol. 132: 493-505.

- PANET, A.; J.H. VAN DE SANDE; P.C. LEOWEN; H.G. KHORANA; A.J. RAAE; J.R. LILLEHAUG y K. KLEPPE (1973). *Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase, and deoxyribonucleic acid polymerase*. Biochemistry 12: 5045-5050.
- SILHAVY, T.J.; M.L. BERMAN Y L.W. ENQUIST (1984). *Experiments with gene fusions*. CSHL, USA: 95-97.
- WEISS, B Y C.C. RICHARDSON (1967). *Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. I. Repair of single strand breaks in DNA by an enzyme system from E. coli infected with T4 bacteriophage*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 57: 1021-1028.
- WEISS, B; A.JACQUEMIN- SABLON; T.R. LIVE; G.C. FAREED y C.C. RICHARDSON (1968). *Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, further purification and properties of polynucleotide ligase from E. coli infected with bacteriophage T4*. The Journal of Biological Chemistry 243: 4543-4555.
- WILSON, G.G. Y N.E. MURRAY (1979). *Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4. I. Characterization of recombinants*. J. Mol. Biol. 132: 471-491.