

### Purificación de la enzima de restricción *Nci I*

L. E. TRUJILLO, G. REYES, E. BAYOLO, M. M. VÁZQUEZ y O. GARCÍA

División de Enzimas de Restricción y Modificación, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en noviembre de 1989

Aprobado en febrero de 1990

#### RESUMEN

La enzima de restricción *Nci I* producida por el microorganismo *Neisseria cinerea*, se purificó en nuestro laboratorio utilizando cromatografía de afinidad y de intercambio iónico, lo que permitió obtener una preparación enzimática con una actividad específica de 20 000 U/mg de proteínas y 69,2% de recobrado global del proceso apta para ser usada en los diferentes trabajos relacionados con la ingeniería genética.

#### SUMMARY

*Nci I* restriction endonuclease isolated from *Neisseria cinerea*, has been purified in our laboratory using affinity and ion exchange chromatography. We have obtained an enzymatic preparation with a specific activity of 20 000 U/mg of proteins and 67,2% of global recovery of the process, that may be used in different genetic engineering techniques.

#### INTRODUCCION

La enzima de restricción *Nci I* reconoce la secuencia CC (C-G) GG en el ADN del fago lambda ( $\lambda$ ) y otros sustratos, generando fragmentos de ADN con extremos 5' protuberantes (Watson *et al.*, 1980). Esta enzima reviste gran importancia, pues es la única endonucleasa de restricción encontrada

que libera los terminales 3' fosfato y 5' hidroxilo una vez concluida la digestión del ADN (Hu y Marschel, 1982; Roberts, 1981), además de que en virtud de la frecuencia con que reconoce secuencias en diferentes sustratos, es capaz de crear fragmentos de ADN relativamente pequeños que pueden ser utilizados en estudios de secuenciación.

Tomando como base lo antes expuesto, se comenzó la purificación de esta proteína según lo establecido por Watson *et al.* (1980) consistente en una cromatografía de afinidad utilizando la resina Heparin Sepharose (Pharmacia), pero al llevarla a la práctica, encontramos que en estas condiciones de trabajo no se obtenía una preparación enzimática pura, ya que existía color en la preparación final así como exonucleasas contaminantes al exponer el ADN a 60 veces de sobredigestión.

Estos resultados fueron eliminados con la optimización del gradiente de elución de la Heparin sepharose (Pharmacia) y posteriormente una cromatografía de intercambio iónico utilizando S-Sepharose (Pharmacia), lo que permitió la obtención de una preparación final de alta calidad.

## MATERIALES Y METODOS

### Crecimiento del microorganismo

La bacteria *N. cinerea* se creció en erlenmeyers de 2 l, conteniendo 500 ml de medio Brain Heart Infusion (BHI, OXOID) con NAD y Haemín, durante 31 horas a 37°C, con agitación vigorosa. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3500 rpm a 4°C y lavadas con buffer 10 mM Tris HCl, pH 7,5, y 10 mM 2-mercaptoetanol. La biomasa fue almacenada a -70°C. El rendimiento fue de tres gramos de biomasa húmeda/litro de cultivo.

### Purificación de la enzima de restricción

Fueron resuspendidos 15 gramos de biomasa húmeda en 30 ml de buffer A que contiene 20 mM Tris HCl, pH 7,5, 0,5 mM EDTA y 6 mM de 2-mercaptoetanol. La ruptura se llevó a cabo en una prensa francesa (1 500 kgf/cm<sup>2</sup>) y el lisado se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 horas a 4°C. El extracto crudo fue aplicado a una columna con aproximadamente 15 ml de Heparin Sepharose (Pharmacia) equilibrada con buffer A (descrito anteriormente). Se aplicó un gradiente de 250 ml de 0 a 0,6 M de NaCl colectándose fracciones de 5 ml. Las fracciones con actividad se unieron y se dializaron contra buffer B compuesto por 10 mM de fosfato de potasio pH 7,0; 0,5 mM EDTA y 6 mM de 2-mercaptoetanol, y posteriormente se aplicaron a una columna de 20 ml de S-Sepharose de alto flujo (Pharmacia) equilibrada previamente con buffer B.

Se aplicó un gradiente lineal de 160 ml, de 0 a 1 M de NaCl. Se reunieron las fracciones con actividad y se dializaron contra el buffer de almacenamiento (Biolabs) compuesto por 50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 100 µg/ml de seroalbúmina bovina Sigma (BSA) y 50% de glicerol. Finalmente se almacenó a -20°C.

Todas las sales y otros reactivos utilizados en los diferentes buffers se obtuvieron de: Merck, Fluka, LKB y BDH. La BSA de la Sigma se liberó de endonucleasas inespecíficas en nuestro laboratorio, utilizando el procedimiento de Trujillo *et al.* (1989).

### ADNs y enzimas utilizadas

El ADN del fago λ se obtuvo en nuestro laboratorio utilizando la cepa *E. coli* CSH-45 (Cold Spring Harbor Collection) según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982) modificado por Yamamoto *et al.* (1970) y por el procedimiento de Davis (1980). La enzima T4 ADN ligasa fue producida por ENZIBIOT (CIGB, Cuba) siguiendo el procedimiento de Carballeira y Herrera (1990).

### Determinación de la concentración de proteínas

Estas determinaciones se realizaron utilizando la técnica descrita por Bradford (1970).

### Determinación de la actividad enzimática

Una unidad de *Nci I* (Cat. BRL 1983/84) se define como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1 µg de ADN de λ en 60 minutos, en un volumen total de reacción de 50 µl utilizando el buffer de ensayo (Biolabs) que contiene 25 mM de NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoetanol y 100 µg/ml de albúmina de suero bovino. Los resultados se observan en un gel de agarosa 1,4% en buffer tris acetato según Maniatis *et al.* (1982) compuesto por 48,40 g de Tris y 1,46 g de EDTA disueltos en 800 ml de H<sub>2</sub>O (el pH se ajusta a 7,9 con ácido acético) y posteriormente se tiñe con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

### Determinación de la presencia de exonucleasas contaminantes

Se incubaron 100 o más unidades de la enzima durante varias horas a 37°C con 1 µg de ADN de Lambda en 50 µl del buffer de ensayo adecuado (Biolabs) descrito anteriormente. Transcurrido este tiempo, el patrón normal de bandas resultante de la digestión del ADN, debe observarse sin alteraciones en un gel de agarosa 1,4% tris acetato (descrito con anterioridad) teñido con bromuro de etidio.

### Ensayo de corte y recorte

Este ensayo consiste en sobredigerir con *Nci I* 10 µg de ADN de λ, ligar los fragmentos resultantes con ADN T4 ligasa y posteriormente recortar con la misma enzima. Si se observan los patrones normales de bandas para cada caso, podemos afirmar que los extremos 3' y 5' del ADN no han sido afectados por la acción de exonucleasas y fosfatasa contaminantes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se observa la detección de actividad enzimática en las diferentes fracciones resultantes del gradiente de elución aplicado a la Heparin Sepharose, donde se observa que eluye en las fracciones 11 a la 37 (que corresponden con 0,19-0,35 M de NaCl). La mayor actividad de *Nci I* (80 U/µl) se encontró desde



la fracción 23 a la 35. Es bueno destacar que a causa de la ampliación del gradiente, la enzima eluye en fracciones que no poseen color, lo que demuestra la eficiencia de este, mientras que al aplicar un gradiente de elución de 120 ml de 0 a 1 M de NaCl, como el reportado por Watson *et al.* (1980) la actividad *Nci I* se detecta en fracciones con coloración, lo que afecta la pureza de la preparación final.

dilución de la preparación final se realiza con el objetivo de buscar concentraciones de la enzima óptimas para su chequeo posterior.

Los controles correspondientes a la detección de posibles contaminantes en la preparación enzimática se exponen en las figuras 3, 4 y 5.

En el primer caso, se muestra el ensayo de detección de exonucleasas contaminantes

C 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37

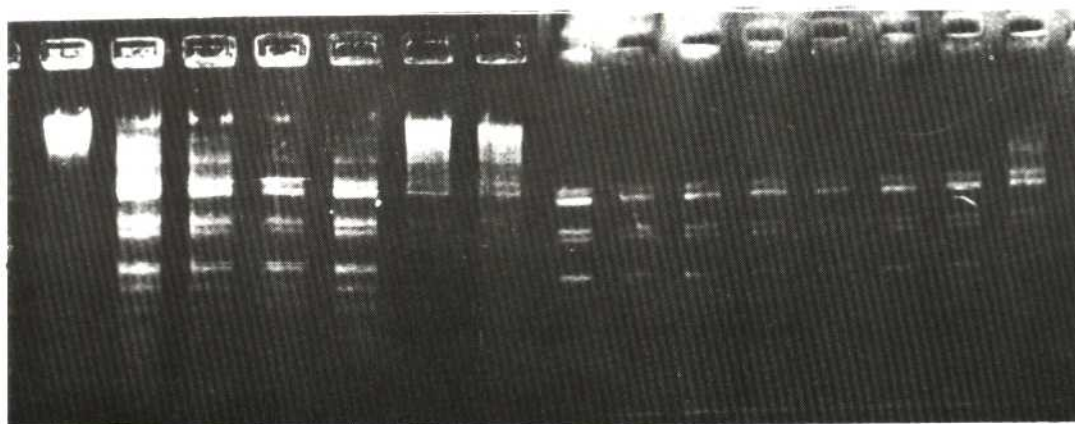


FIG. 1. Análisis de las fracciones obtenidas del gradiente de elución practicado a la columna de *Heparin sepharose*. De izquierda a derecha: 1) 1  $\mu$ g de ADN del fago  $\lambda$  como control. Las restantes líneas se corresponden con los resultados del chequeo de actividad enzimática a las fracciones 11 a la 37 respectivamente, el cual se realizó tomando 2  $\mu$ l de cada 2 fracciones (fracciones alternas) incubándolo 1 hora a 37°C.

La figura 2 muestra el chequeo de actividad de las fracciones correspondientes al resultado del gradiente de elución practicado a la columna de S-Sepharose, observándose que la mayor actividad de *Nci I* (120 U/ $\mu$ l) es detectada en las fracciones de la 4 a la 11. La enzima eluyó desde 0,20 M a 0,55 M de NaCl.

La detección de actividad de la preparación final, previa dilución (cinco veces) con buffer de almacenamiento Biolabs, se muestra en la figura 3 donde se observa que la enzima *Nci I* presenta 300 U/ $\mu$ l. Esta

practicado a la preparación de *Nci I* donde se observa que el patrón de bandas permanece inalterable al sobredigerir 1  $\mu$ g de ADN de  $\lambda$  con un exceso de enzima de 800 veces; este patrón de bandas se verifica tomando como control la enzima comercial. En el segundo caso, donde se exponen los resultados del ensayo de corte, ligazón y recorte, se evidencia que la enzima está libre de exonucleasas y fosfatasa que podrían afectar los extremos terminales 3' y 5' impidiendo una correcta ligazón o recorte.

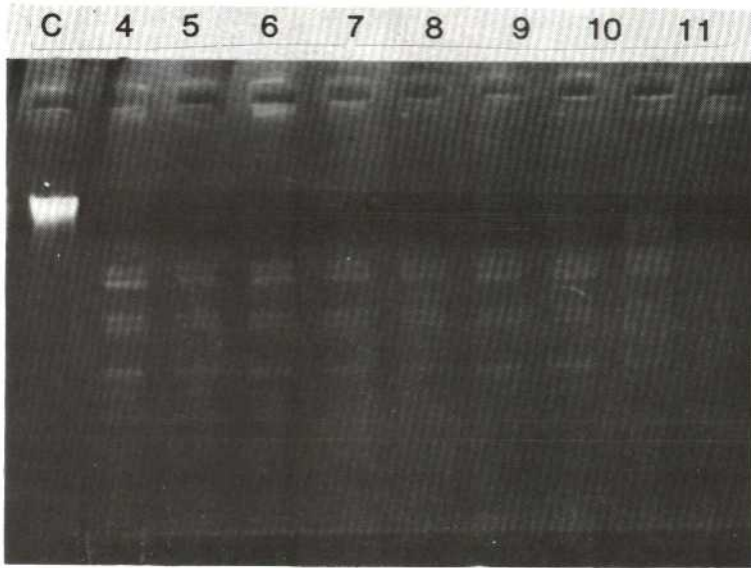


FIG. 2. Chequeo de actividad enzimática a las fracciones resultantes del gradiente de elución aplicado a la columna de S-Sepharose. De izquierda a derecha: 1) 500 ng de ADN del fago  $\lambda$  como control. Las restantes líneas se corresponden con el chequeo de actividad a las fracciones del gradiente, de la 4 a la 11 respectivamente, incubando  $2 \mu\text{l}$  de cada fracción con  $1 \mu\text{g}$  de ADN de  $\lambda$  durante 60 minutos.

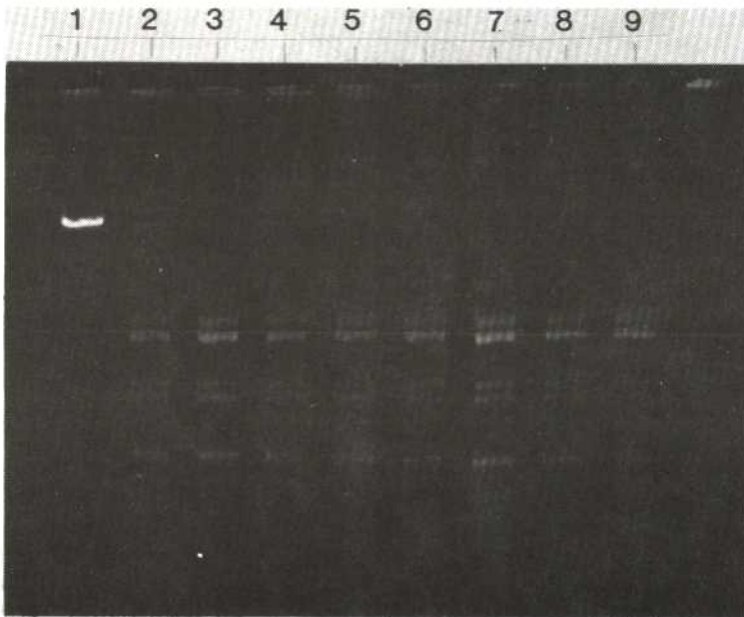


FIG. 3. Ensayo de detección de actividad enzimática a la preparación final de *Nci I* diluida 5 veces. De izquierda a derecha: 1)  $1 \mu\text{g}$  de ADN del fago  $\lambda$  control; 2) Dilución 1/40; 3,4,5,6,7) Diluciones 1/30, 1/25, 1/20, 1/15, 1/10, de la enzima; 8 y 9)  $1 \mu\text{l}$  de *Nci I* obtenida por nuestro método y  $1 \mu\text{l}$  de enzima comercial respectivamente.

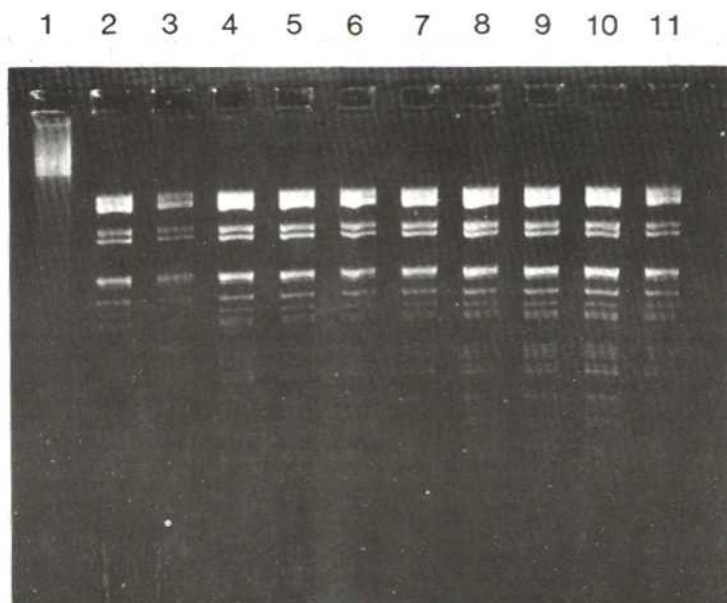


FIG. 4. Detección de exonucleasas contaminantes en la preparación final. 1) 1  $\mu$ g ADN del fago lambda como control; 2,3,4,5,6,7,8,9) Sobredigestiones de la enzima 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 veces respectivamente; 10) 1  $\mu$ l directo de *Nci I* producida por este método, y 11) 1  $\mu$ l de *Nci I* comercial.

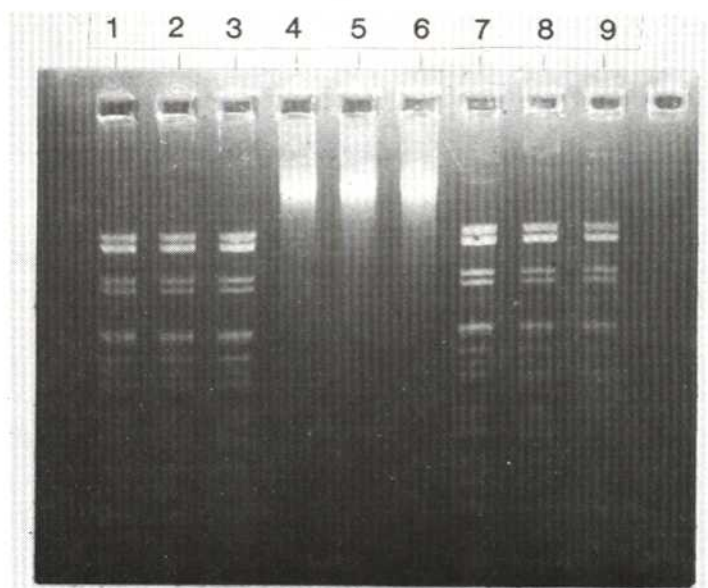


FIG. 5. Ensayo de corte, ligazón y recorte: 1) 1  $\mu$ g de ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Nci I* como control; 2 y 3) ADN del fago  $\lambda$  sobredigerido con *Nci I* 2 y 5 veces; 4,5,6) ligazones con ADN T4 ligasa de los fragmentos resultantes de la digestión; 7,8,9) recorte con la misma enzima.



El resumen de la purificación se muestra en la tabla 1, donde se observa que se obtiene una actividad específica de 20 000 U/mg de proteína y 69,2% de recobrado global del proceso.

## REFERENCIAS

- Bethesda Research Laboratories Catalog (1983/84). BRL, INC.  
 BIOLABS Catalog (1988/89). New England Biolabs, Inc.

Tabla 1  
 RESUMEN DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN Nci I

Etapas	Proteína total (mg)	Actividad enzimática (u. totales)	Actividad específica (u/mg)	% Recobrado	Veces de purific.
Crudo	6 000	$1,3 \times 10^6$	217	100,0	0
Heparin sepharose	300	$1,0 \times 10^6$	3 333	75,0	15
S-sepharose	45	$9,0 \times 10^5$	20 000	69,2	92

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos tomando en consideración las variantes realizadas al protocolo de Watson *et al.* (1980) nos permitieron obtener  $9 \times 10^5$  unidades totales de Nci I a partir de 15 g de biomasa húmeda, lográndose un recobrado global del proceso de 69,2% con una actividad específica de 20 000 U/mg de proteína, además de presentar un alto grado de pureza en cuanto a exonucleasas y fosfatasas contaminantes, lo que asegura un alto grado de confiabilidad al usar esta preparación en los trabajos de ADN recombinante. Es bueno destacar que utilizando este método, la preparación enzimática obtenida fue purificada 92 veces.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todos los compañeros que hicieron posible llevar a cabo este trabajo, en especial al Dr. Luis Herrera por la revisión crítica del manuscrito.

- BRADFORD, M. M. (1970). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 240-254.  
 CARBALLEIRA, N. y L. HERRERA (1990). Optimización de las condiciones de purificación de la T4 ADN ligasa. *Biología Aplicada* 7: 204-212.  
 DAVIS, R.W. (1980). *Advances in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor 165-189.  
 HU, A.W. y A.H. MARSCHEL (1982). Unpublished observation. *Biochemicals for Molecular Biology*. Boehringer Catalog. 82.  
 MANIATIS, T.; E. F. FRISH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, USA.  
 ROBERTS, R. J. (1981). *Restriction and modification enzymes and their recognition sequences*. N.A.R 9: 75.  
 TRUJILLO, L. T.; L. CASTELLANOS; O. GARCIA y L. HERRERA (1989). A protocol for the obtention of Bovine Serum Albumin free of deoxyribonuclease activity. *Biotechniques* 9(5): 620-623  
 WATSON, R.; M. ZUKER; S. MARTIN y P. VISENTIN (1980). A new site specific endonuclease from *Neisseria cinerea*. *Febs Lett.* 118: 47-50.  
 YAMAMOTO, K. R.; B. M. ALBERTS; R. BEZINGER; L. LAWHORNE, y G. TREIBER (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology* 40: 734-740.