

Purificación de la enzima de restricción *Sma I*

L. E. TRUJILLO, J. E. BRITO, G. REYES 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 *Sma I*, producida por el microorganismo *Serratia marcescens*, ha sido purificada en nuestro laboratorio utilizando precipitación con PEG 6000 y cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa (P-11 Whatman), obteniéndose una preparación final con una actividad específica de 2971 U/mg de proteína y 35% de recobrado total del proceso de purificación apta para ser utilizada en los experimentos de clonación y otras técnicas del ADN recombinante.

SUMMARY

Sma I restriction endonuclease produced by *Serratia marcescens*, has been purified in our laboratory using PEG-6000 precipitation and ion exchange chromatography in Phosphocellulose (P-11 Whatman). We have obtained by this way a final enzymatic preparation with a specific activity of 2972 U/mg of total protein and 35% of global recovery of the process, that may be used in cloning and other recombinant DNA techniques.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha prestado gran interés al aislamiento y purificación de

endonucleasas de restricción del tipo II, con motivo del importante papel que desempeñan en los estudios relacionados con la biología molecular y la genética (Roberts, 1981).

Para la purificación de la enzima de restricción *Sma I* se establecieron con anterioridad algunos protocolos como el utilizado por Guerra*, en el que el extracto crudo se aplicaba directamente en una resina de fosfocelulosa (P-11 Whatman) previa ultracentrifugación. Utilizando este protocolo, se obtuvieron preparaciones finales con buena calidad pero existieron pérdidas considerables de la enzima en los lavados durante el proceso de purificación, los cuales afectaron los rendimientos finales en virtud de la poca interacción de la proteína con la matriz de intercambio.

Esta pobre interacción proteína matriz pudo ser provocada por la presencia en el extracto crudo de algunas sustancias que no sedimentaban después de la ultracentrifugación. Se ensayó el método de precipitación

* Guerra, M.: Comunicación personal. CIGB.

salina de la proteína utilizando sulfato de amonio (70% concentración final) antes del paso cromatográfico, lo que resultó ser un buen método para separar la enzima de las partículas en suspensión, pero se encontró que al dializar o diluir la preparación para reducir los niveles de sal se inactivaba totalmente la enzima aun cuando se disminuyeron los tiempos de diálisis a causa de la inestabilidad de la misma.

En este trabajo se expone el procedimiento mediante el cual se obtuvo la enzima de restricción *Sma I* con alto rendimiento y con niveles de pureza tales que permiten su uso en las diferentes técnicas de clonación, mediante un protocolo en el que se utilizó una precipitación con polietilenglicol (PEG-6000) (Schleif, 1980), y cromatografía en fosfocelulosa (P-11 Whatman).

MATERIALES Y METODOS

Crecimiento del microorganismo

La bacteria productora de esta enzima *Serratia marcescens* (Biolabs 231 Dnasa⁺), se creció hasta la fase logarítmica en 30 litros de medio SLBH compuesto por Triptona (Oxoid) 11 g/l, Extracto de Levadura (Oxoid) 22,5 g/l y Di-hidrógeno fosfato de potasio 9,08 g/l a 37°C en un fermentador de 50 litros (volumen total). Las células fueron colectadas por centrifugación y fueron almacenadas a -20°C. El rendimiento fue de 5 g de biomasa húmeda/litro de cultivo.

Purificación de la enzima de restricción *Sma I*

Veinte gramos de células (biomasa húmeda) fueron resuspendidos en 80 ml de buffer S (10 mM de fosfato de potasio pH 7,4; 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol, 200 mM KCl, 0,2 mM de PMSF y 1 mM de benzamidina).

La ruptura celular se efectuó en prensa francesa a 1 500 kgf/cm² seguido de 30 segundos de ultrasonido. El debris celular se separó por ultracentrifugación (120 000 g) durante 2 horas a 4°C.

El sobrenadante se extrajo cuidadosamente, evitando que se mezclara con algunas partículas del debris celular, que aun después de la ultracentrifugación,

permanecían en suspensión. Posteriormente se le añade 1/10 del volumen total de una solución de PEG 6000 a una concentración de 7,5%, dejándose en reposo a 0°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 18 000 g y a 4°C. El sobrenadante se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en P-11 (fosfocelulosa-Whatman) empacada en una columna de 1,6 x 15 cm (30 ml), previamente equilibrada con buffer S. Posteriormente, se lavó la matriz con 500 ml del mismo buffer hasta que la absorción a 280 nm del efluente coincidió con la del afluente, eluyendo con un gradiente lineal de 0,2 a 0,8 M de KCl, colectándose 5 ml por fracción. Se tomaron 3 µl de cada fracción colectada para la medición de la actividad enzimática. Las fracciones con actividad (más de 40 U/µl) se unieron y se dializaron contra buffer de concentración Biolabs 1988/89 [50% de glicerol, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 7,4; 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 200 µg/ml BSA (Sigma)] y posteriormente se almacenó a -20°C.

Todas las sales utilizadas en la elaboración de los diferentes buffers y demás reactivos, se obtuvieron de fuentes comerciales.

ADNs y enzimas utilizados

El ADN del fago λ fue obtenido en nuestro laboratorio a partir de la cepa de *E. coli* CSH-45 (Cold Spring Harbor Collection) según el procedimiento de Maniatis *et al.* (1982) modificado por Yamamoto *et al.* (1970). Los plasmidios pUC18 y pUC19 se obtuvieron en nuestro laboratorio según el procedimiento de Maniatis *et al.* (1982). La enzima T4 ADN ligasa fue producida por ENZIBIOT (CIGB, Cuba) según modificaciones realizadas al protocolo de Davis (1980) por Carballeira y Herrera (1990).

Determinación de la concentración de proteína

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo el método establecido por Bradford (1976).

Geles

Todos los geles de agarosa elaborados para mostrar los resultados de cada uno de los diferentes ensayos que aparecen a continuación, fueron preparados según Maniatis *et al.* (1982).

Determinación de la actividad enzimática

Una unidad de *Sma I* (Biolabs 1988/89) se define como la cantidad de enzima capaz de digerir completamente 1 µg de ADN del fago λ en 1 hora

a 25°C en 50 µl de buffer de ensayo compuesto por 20 mM KCl, 6 mM Tris HCl pH 7,5; 6 mM 2-mercaptoetanol, 6 mM MgCl₂ y 100 µg/ml de BSA. Los resultados se evaluaron en un gel de agarosa 0,6% -Tris acetato.

Determinación de la actividad de exonucleasas contaminantes

Este ensayo se realiza incubando 20 U de la enzima durante 1, 5, 10 y 20 horas respectivamente a 37°C, con 1 µg de ADN de λ en 50 µl de buffer de ensayo descrito con anterioridad (Biolabs 1988/89). Si al transcurrir este tiempo se obtiene el patrón normal de bandas de la enzima en un gel de agarosa 0,6% de Tris acetato teñido con bromuro de etidio, entonces no existe actividad de exonucleasas bajo las condiciones ensayadas.

Determinación de la actividad de endonucleasas contaminantes

Diez unidades de *Sma* I se incubaron a 25°C durante 35,30,25,20,15 y 10 horas respectivamente, con 1 µg del plasmidio pUC19 en 50 µl de buffer de ensayo descrito con anterioridad. Los resultados se chequearon en un gel de agarosa 0,8% en buffer Tris borato teñido con bromuro de etidio. La integridad del material demuestra la ausencia de endonucleasas (Biolabs 1988/89).

Determinación de la capacidad para la clonación

Diez microgramos del plasmidio pUC18 se sometieron a sobredigestión con *Sma* I de 2 a 5 veces, se ligó con T4 ADN ligasa y se recortó con la misma enzima. Un patrón normal de bandas después del corte y la ligazón indica que los extremos 3' y 5' están intactos, por lo que no existió actividad de

exonucleasas y fosfatasas. Al material resultante se le chequea posteriormente la eficiencia de transformación en células competentes siguiendo el procedimiento de Golub (1988). Estos ensayos se realizaron en un volumen de 60 µl. En el caso de los cortes, 1 µg del plasmidio pUC18 se incubó 1 hora a 25°C y en el caso de las ligazones, se realizaron a 15°C durante toda la noche. Los resultados se observan en un gel de agarosa 1% en buffer Tris borato. Este ensayo se realizó según IBI (1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

La precipitación con PEG-6000, aunque solamente purificó tres veces la preparación enzimática según aparece en la tabla 1, eliminó del sobrenadante aquellas sustancias que no sedimentan después de la ultracentrifugación, por lo que se obtuvo un extracto totalmente libre de partículas en suspensión para su posterior aplicación a la columna de fosfocelulosa. Como se muestra en esa misma tabla, esta precipitación no afectó la actividad de *Sma* I, y el porcentaje de recobrado obtenido es superior 10 veces al reportado.

La enzima eluyó de la columna de fosfocelulosa entre 0,3 y 0,4 M de KCl, mostrándose en la figura 1 el resultado de la detección de la actividad *Sma* I en las diferentes fracciones resultantes del gradiente lineal, en un gel de agarosa 0,8% -Tris acetato teñido con bromuro de etidio.

Tabla 1
RESUMEN DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA DE RESTRICION *Sma* I

Etapas	Proteína total (mg)	Actividad enzimática (u. totales)	Actividad específica (u/mg)	% Recobrado	Veces de purif.
Crudo	6 800	1,6 x 10 ⁶	258	100	0
Precip. PEG	2 200	1,6 x 10 ⁶	727	100	3
P-11	195	5,6 x 10 ⁵	2 971	35	11

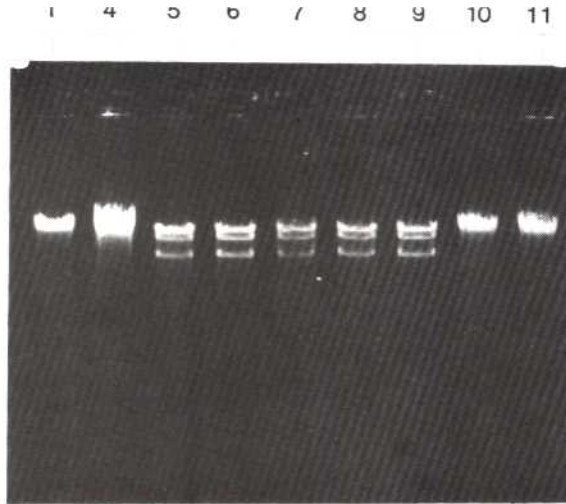


FIG. 1. Fragmento del gradiente de elución de la enzima *Sma I* analizado en gel de agarosa 0,8% TA. 1 μ g de ADN de fago λ se incubó con 1 μ l de cada fracción en el buffer de ensayo correspondiente a 25°C. De izquierda a derecha: 1) 1 μ g de ADN de λ como control. Las restantes líneas se corresponden con las fracciones de la 4 a la 11 respectivamente, evidenciándose la actividad *Sma I* de la fracción 5 a la 9.

La figura 2 muestra el ensayo de actividad realizado a la preparación final de la enzima una vez concentrada y con las condiciones óptimas de almacenamiento (Biolabs 1988 /89), donde se concluye que

la preparación presenta 60 U/ μ l, ya que la dilución 1/60 es el último punto en que se observa el patrón de bandas característico, resultante de la digestión del ADN del fago λ con esta enzima.

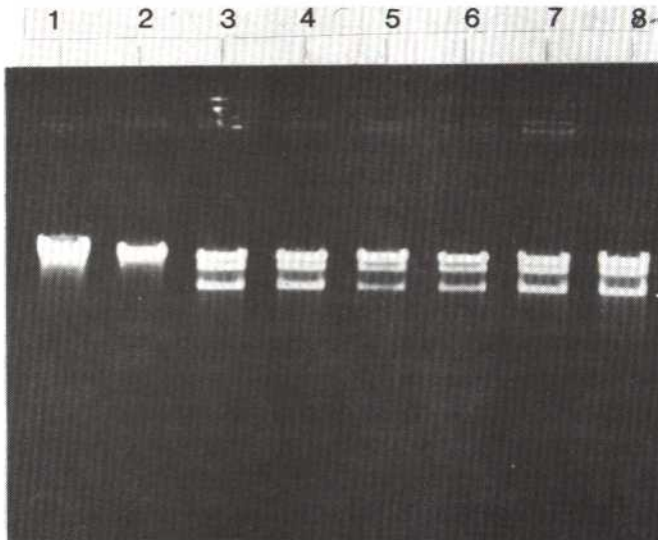


FIG. 2. Ensayo de detección de actividad enzimática de la preparación final. De izquierda a derecha: 1) 1 μ g de ADN de λ control, 2) dilución 1/65 de la enzima; 3,4,5,6,7) diluciones 1/60, 1/40, 1/30, 1/20 y 1/10 de la enzima respectivamente; 8) 1 μ l de *Sma I* sin diluir. Los resultados se observan en un gel de agarosa 0,8% TA.

Los controles de calidad llevados a cabo para la detección de exonucleasas y endonucleasas contaminantes, aparecen en las figuras 3 y 4, observándose para el primer caso que el ADN del fago λ utilizado

como sustrato, resiste un exceso de *Sma I* de 400 veces sin afectar el patrón de bandas resultante de la digestión del ADN con esta enzima, lo que demuestra la ausencia de exonucleasas bajo estas condiciones.

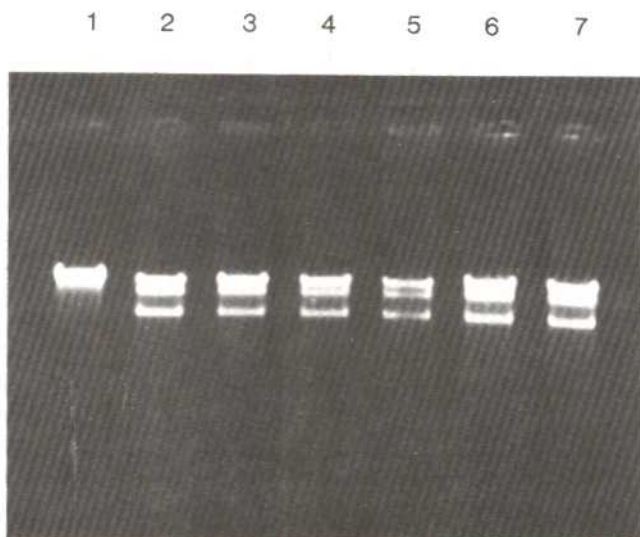


FIG. 3. Ensayo de detección de exonucleasas contaminantes. De izquierda a derecha 1) 1 μ g de ADN de λ control; 2,3,4,5) sobredigestión de la enzima 400, 300, 200 y 100 veces; 6 y 7) digestión de ADN de λ con una unidad de *Sma I* comercial y con la misma cantidad de enzima obtenida por este método respectivamente.



FIG. 4. Ensayo de detección de endonucleasas contaminantes. De izquierda a derecha: 1) 1 μ g del plasmidio pUC19. En las líneas 2,3,4,5 y 6, se muestran los resultados de sobredigestión de la enzima de 350, 300, 250, 200 y 150 veces respectivamente.

En el segundo caso se aprecia la ausencia de endonucleasas al observar que el plasmidio pUC19 mantiene su integridad al ser incubado con un exceso de enzima de 350 veces.

En cuanto a la capacidad para la clonación, se observa en la figura 5 que se obtuvo una buena ligazón (más del 90% de los fragmentos de ADN están ligados) en los puntos ensayados correspondientes a 5 veces de sobredigestión de la enzima y 20 veces de sobredigestión respectivamente.

Esto permitió obtener un alto número de transformantes, lo que evidencia la ausencia de exonucleasas y fosfatasas que podían afectar los extremos 5' y 3' del ADN utilizado para este ensayo.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que con el uso de la precipitación con PEG-6000, seguida por la cromatografía de intercambio iónico (P-11 Whatman), se purifica 11 veces la enzima obteniéndose un rendimiento de 28 000 U/g de biomasa húmeda, con una actividad específica de 2 971 U/mg de proteína y un recobrado global del proceso de 35%. Con esta precipitación con PEG 6000, antes del paso cromatográfico, se logra una mayor interacción de la proteína con la matriz de intercambio, lo que se traduce en que durante el lavado las pérdidas son mínimas, significando una

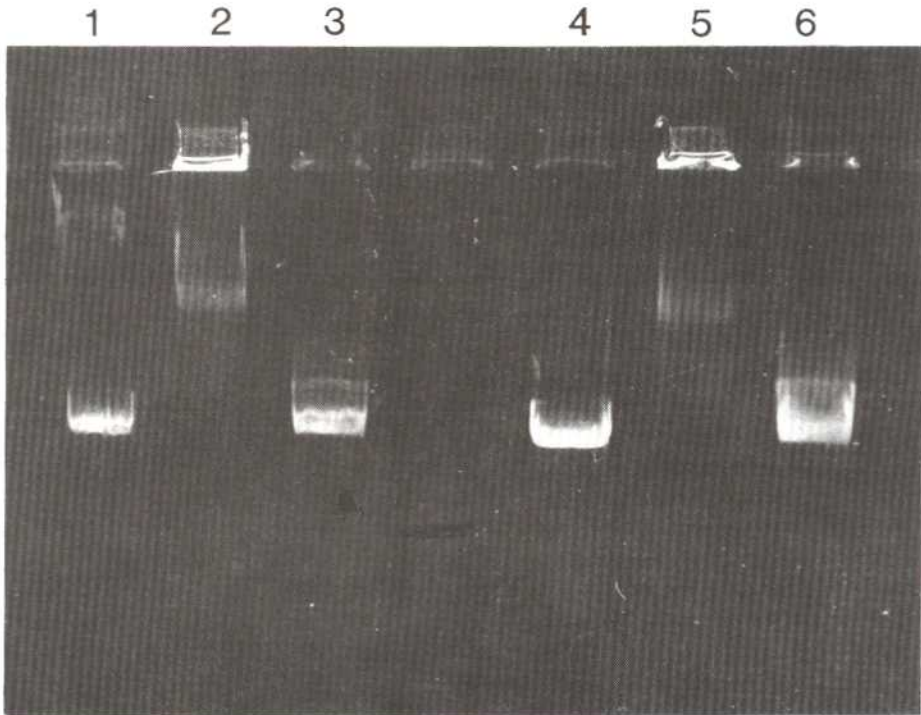


FIG. 5. Determinación de la capacidad para la clonación. De izquierda a derecha: 1) 1 μ g de pUC18 cortado con 5 unidades de *Sma* I; 2) ligazón con T4 ADN ligasa; 3) recorte con la misma enzima. Las líneas 4,5,6, corresponden al mismo ensayo, pero con 20 unidades de enzima.

mejora al procedimiento llevado a cabo por Guerra (anteriormente citado); además, usando esta precipitación se elimina el paso de la diálisis, ya que el extracto crudo resultante se aplica directamente a la resina (previa centrifugación), con lo que disminuyen las pérdidas por inactivación. La preparación de *Sma I* obtenida por este método, no presentó nucleasas inespecíficas ni fosfatasas contaminantes, lo que permite su uso en los diferentes trabajos genéticos y moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos los que de una forma u otra contribuyeron con la realización de este trabajo y al Dr. Luis Herrera por la revisión crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

- Biolabs Catalogue (1988/89). *New England Biolabs, Inc.*
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- 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., pp. 165-189.
- GOLUB, E. I. (1988). One minute transformation of competent *Escherichia coli* by plasmid DNA. *N.A.R* **16**: pp. 235.
- IBI Catalogue (1985). International Biotechnologies, Inc.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). Molecular cloning. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Lab. Press, New York, U.S.A.
- ROBERTS, R. J. (1981). Restriction enzymes and their recognition sequences. *N.A.R* **11**: r135-r167.
- SCHLEIF, R. (1980). *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York **65**: 19-23.
- 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**: 734-743.