

β -galactosidasa de alta pureza obtenida por cromatografía de interacción hidrofóbica

I. ROJAS, C. MELLA y L. COSTA

Agrupación de Planta Piloto, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en febrero de 1990

Aprobado en marzo de 1990

RESUMEN

Se presenta un procedimiento de obtención de β -galactosidasa recombinante en *Escherichia coli* con una pureza superior al 95% basado en dos pasos de purificación y solo uno de ellos cromatográfico. Se combinaron en el trabajo la precipitación salina y la cromatografía de interacción hidrofóbica en Fractogel TSK butilo 650 M, alcanzándose en esta última una alta resolución mediante el ajuste efectivo de los parámetros determinantes en esta operación.

SUMMARY

A procedure for the obtention of recombinant β -galactosidase from *Escherichia coli* is presented. The enzyme has a purity higher than 95% reached with two purification steps, only one of them is chromatographic. The salting-out has been combined with hydrophobic interaction chromatography on Fractogel TSK Butyl 650 M where a high performance was achieved by means of the adjustment of their main parameters.

INTRODUCCION

La β -galactosidasa o β -D-galactósido galactohidrolasa es una enzima que forma parte del citoplasma celular de muchos microorganismos y puede ser constitutiva o inducible (Miller, 1972).

Esta molécula tetramérica contiene cuatro cadenas idénticas y cuatro sitios activos por tetrámero, tiene 1021 aminoácidos por cada cadena y su peso molecular es de alrededor de 100 000 Da cada subunidad (Huber *et al.*, 1982).

La β -galactosidasa participa en la catálisis de algunas reacciones tales como la hidrólisis del residuo β -D-galactosa no reducido terminal en los β -D-galactósidos, la hidrólisis de la lactosa, etcétera.

Sus características estructurales facilitan la formación de conjugados inmuno-enzimáticos y su fácil detección por el desarrollo de reacciones colorimétricas o fluorimétricas por lo que la hacen muy atractiva para ser utilizada como marcadora en inmunoensayos (Agraz *et al.*, 1988).

Como su actividad decrece proporcionalmente al tiempo durante el cual se purifica, fundamentalmente a causa de la acción proteolítica y la formación de agregados moleculares (Ullman, 1984), surgió la necesidad de encontrar un procedimiento rápido y eficiente para su producción en escalas relativamente altas.

La utilización de la cromatografía de afinidad puede resolver el problema anterior (Ullman, 1984), pero es una operación costosa, casi tanto como la enzima, y no resulta rentable.

Precisamente durante el estudio de este tipo de técnica comienza a evidenciarse la utilización de la cromatografía de hidrofobicidad como una alternativa para la purificación de enzimas al observar las diferencias en el comportamiento del tiempo de retención cuando cambia el tamaño de la cadena hidrofóbica que enlaza la matriz con el grupo funcional (Shaltiel, 1983).

La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) se basa, como su nombre lo indica, en el retardo que manifiestan unas moléculas con respecto a otras al interactuar con una matriz cuyos ligandos son generalmente largas cadenas carbonadas con un alto grado de hidrofobicidad, y precisamente las proteínas poseen zonas donde se agrupa un conjunto de amino-ácidos que forman los llamados *parches hidrofóbicos*, que son los responsables de esta interacción (Shaltiel, 1984).

Las proteínas hidrofóbicas no tienen que ser necesariamente solubles en solventes no polares solamente, al contrario, esta cromatografía es usada en la separación de proteínas que son solubles en soluciones acuosas, de manera tal que estas no experimentan prácticamente desnaturalización, a diferencia de la cromatografía de fase inversa, que se basa en el mismo principio, pero a causa de las altas densidades de ligandos es necesario utilizar solventes orgánicos para lograr la desorción (Goheen *et al.*, 1984).

En el procedimiento que se describe a continuación se emplea la CIH como paso determinante para la purificación de β -galactosidasa recombinante, combinada con una precipitación con sulfato de amonio.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un extracto crudo de β -galactosidasa recombinante resultante del cultivo de la cepa JM-103 de *E. coli* transformada con el plasmidio PCB-105 (Agraz, *et al.*, 1988). Todos los reactivos utilizados poseían calidad analítica y fueron suministrados por Merck, RFA. Para los experimentos cromatográficos se utilizó Fractogel TSK butilo 650 M (Merck, RFA).

Las soluciones tampones usadas son las siguientes: el tampón de ruptura está compuesto por Tris hidroximetilaminometano 0,2 M, NaCl 0,2 M, acetato de magnesio 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 5%, sacarosa 100 g/l. Los tampones usados para resuspender el precipitado de sulfato de amonio tienen la siguiente composición: el tampón 1 contiene Tris hidroximetilaminometano 10 mM, cloruro de Magnesio 1 mM y 2-mercaptoetanol 100 mM. El tampón 2 está compuesto por fosfato de sodio 10 mM y el gradiente de sulfato de amonio utilizado en la cromatografía de hidrofobicidad es de 1 M a 0 M.

Método experimental

Obtención de la preparación cruda

Se tomaron 250 g de biomasa húmeda, se resuspendieron en el tampón de ruptura y se rompieron con ultrasonido.

Se centrifugó el producto de la ruptura para separar el debris celular y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 38% de saturación, se centrifugó, y este precipitado se resuspendió alternativamente en las soluciones tamponadas 1 y 2.

Estos dos materiales fueron centrifugados nuevamente para su clarificación y se procedió a la realización de los ensayos cromatográficos respectivos para la determinación del mejor tampón a utilizar para la purificación.

Se utilizaron varias formas de gradientes de concentración de sulfato de amonio para eluir la muestra y se probaron, además, diferentes flujos de operación.

La actividad de β -galactosidasa para seguir el proceso se realizó por el método de Miller (Miller, 1972).

La pureza y la integridad de la molécula se verificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 7,5% (Laemli, 1970) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de filtración en gel con una columna TSK-3000 (Toyo Soda, Japón).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio de la influencia de la composición de los tampones de resuspensión en la calidad del producto final obtenido, mostró la efectividad del tampón 1, al observar en la figura 1 la homogeneidad de la fracción de mayor actividad de β -galactosidasa que se obtuvo al aplicar el precipitado resuspendido en este tampón a la columna de CIH, a diferencia de la muestra resuspendida en el tampón 2, con la cual se obtuvieron dos picos en HPLC que tienen actividad enzimática similar. Esto se explica por la

presencia en el tampón 1 de 2-mercapto-etanol que mantiene a la molécula reducida y homogénea y se evita de esta forma una oxidación irreversible que traería consigo, además, la pérdida de actividad a causa de la posible existencia de cisteínas libres en su sitio activo.

De este resultado se determinó la utilización del tampón 1 para el resto de los experimentos, a pesar de no ser este el tampón de equilibrio de la columna de CIH, que era el paso siguiente.

Como otro parámetro importante para la buena ejecución de esta cromatografía está el flujo de operación.

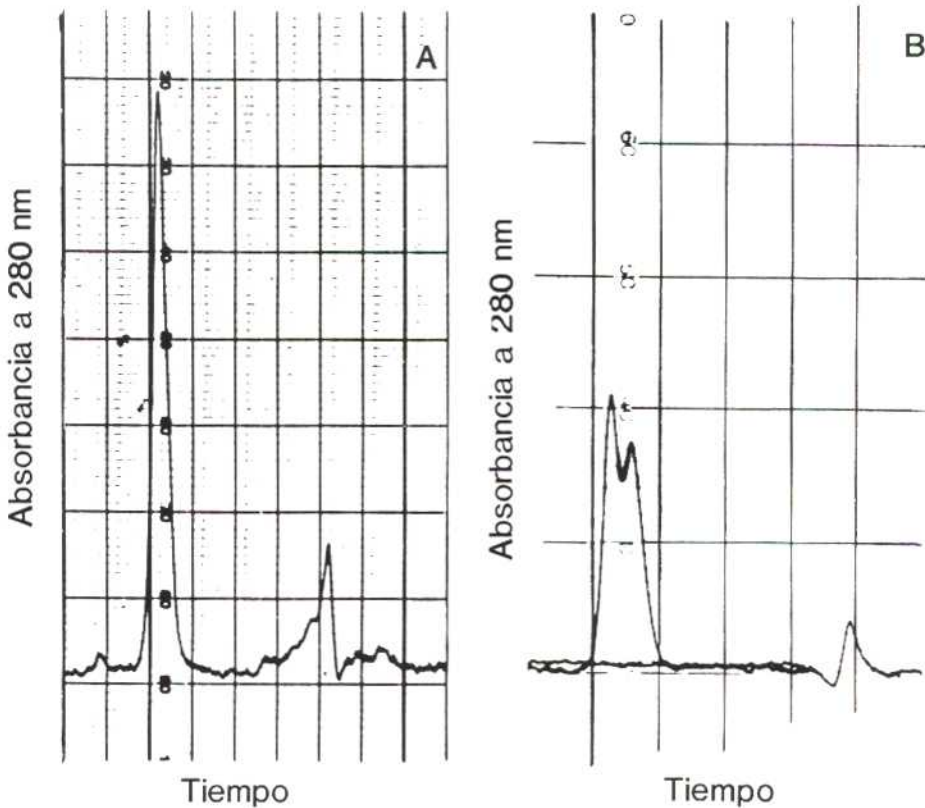


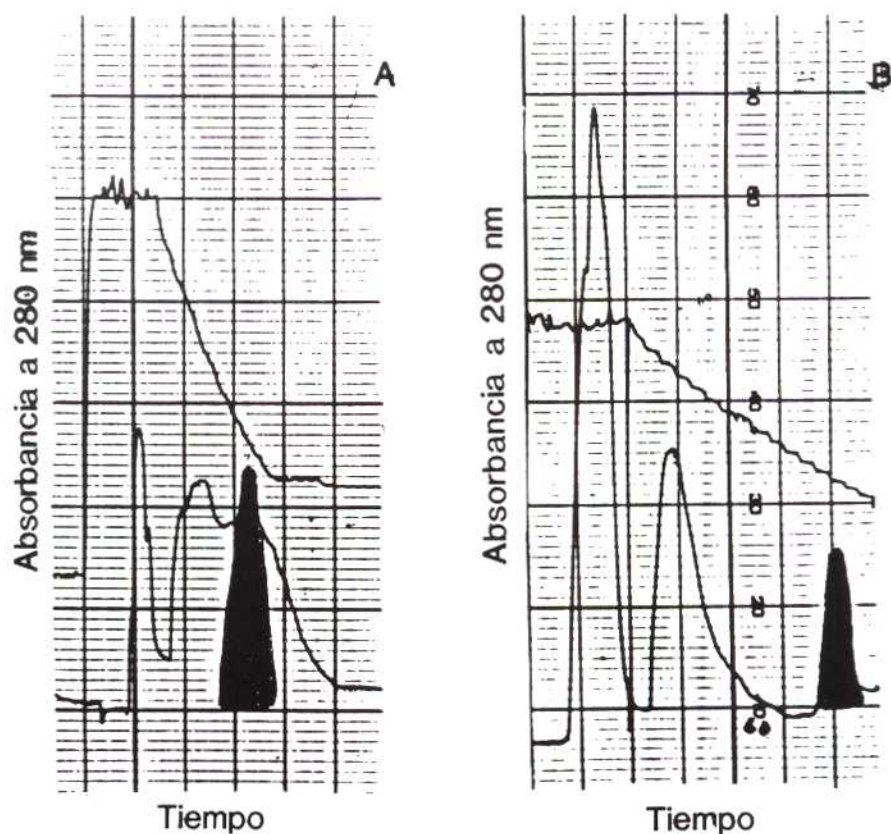
FIG. 1. Perfiles cromatográficos obtenidos al hacer pasar por filtración en gel en HPLC la fracción de actividad de β -galactosidasa separada por hidrofobicidad: A) Cuando se resuspendió el precipitado en tampón NTM; B) cuando se resuspendió el precipitado en tampón fosfato.

Se ensayó con los dos valores de flujo que se encuentran en la figura 2 y puede verse cuánto se afecta la resolución del sistema cuando este se incrementa a 480 ml/h.

Se probaron diferentes formas de realizar gradientes para la desorción, como se muestra en la figura 3, de acuerdo a como iban mejorando la resolución y se escogió el gradiente continuo, lineal, como el más eficiente.

La figura 4 muestra el perfil cromatográfico realizado teniendo en cuenta las mejores condiciones obtenidas como resultado de estos experimentos.

De esta forma se definió el proceso de purificación como una precipitación salina, resuspensión con el tampón 1 y cromatografía de interacción hidrofóbica. En la tabla 1 se muestran las características fundamentales de este procedimiento.



NOTA: La zona sombreada en todos los cromatogramas corresponde a la zona de actividad de β -galactosidasas.

FIG. 2. Perfiles cromatográficos obtenidos al variar el flujo de operación en la cromatografía de interacción hidrofóbica descrita: A) flujo de operación: 480 ml/h; B) flujo de operación: 250 ml/h.

Tabla 1

Paso	Actividad total (UI)*	Actividad específica (UI/mg)	Veces de purificación	Recuperación %
Crudo	$1,9 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$		
Paso 1	$1,5 \times 10^7$	$9,4 \times 10^4$	2,7	78
Paso 2	$9,5 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	8,3	50

* Una UI (unidad internacional) se define como la cantidad de β -galactosidasa que hidroliza 10^{-9} mol/min de orto-nitrofenil galactopiranosido a 28°C .

Paso 1: Precipitación salina;

Paso 2: Cromatografía de interacción hidrofóbica.

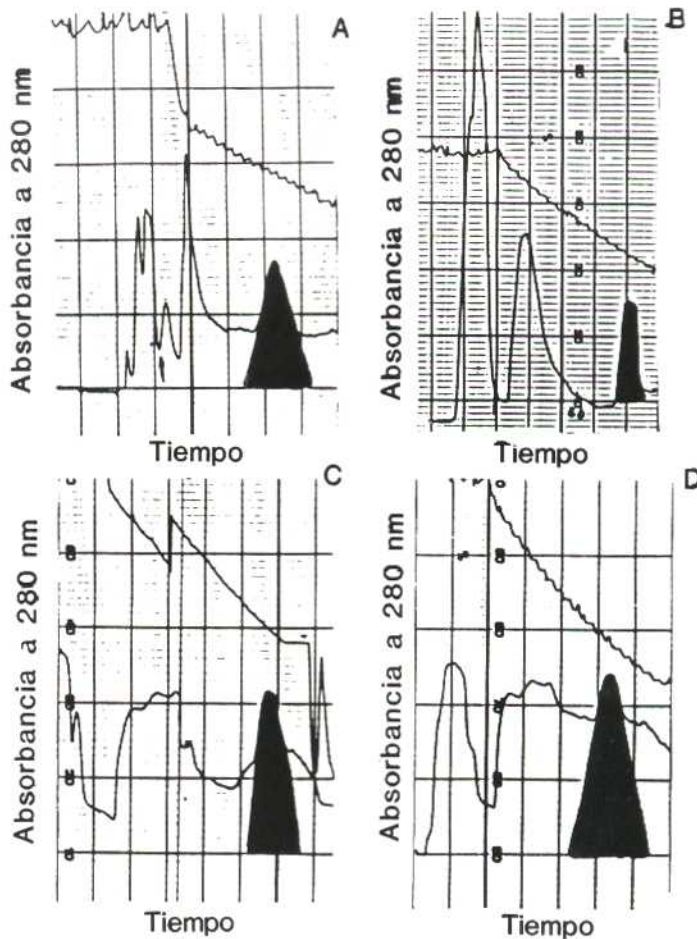


FIG. 3. Perfiles cromatográficos obtenidos al variar los gradientes de fuerza iónica en la cromatografía de interacción hidrofóbica descrita: A) gradiente continuo lineal con dos pendientes; B) gradiente continuo lineal a partir de la salida del primer pico de absorbancia; C) gradiente semicontinuo lineal; D) gradiente continuo exponencial.

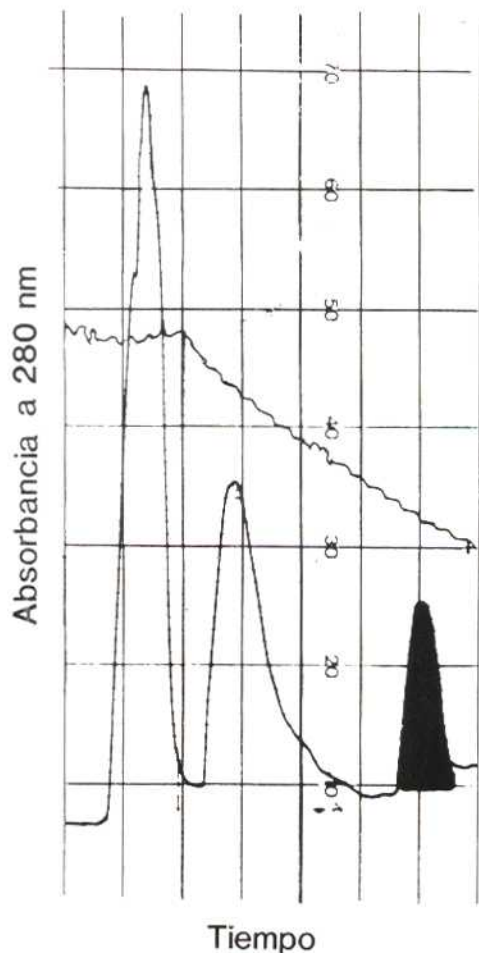


FIG. 4. Perfil cromatográfico obtenido al purificar β -galactosidasa recombinante de *E. coli* con Fractogel TSK butilo 650 M. Condiciones óptimas de separación.

En la figura 5 se muestran las evidencias mediante electroforesis y filtración en gel en HPLC del alto porcentaje de pureza (alrededor de 95%) alcanzado mediante este procedimiento cromatográfico.

La recuperación de la actividad de la enzima fue del 50% tomando como referencia la actividad inicial existente en el crudo (ver tabla 1).

La tecnología desarrollada tiene la gran ventaja del ahorro de tiempo, que es



FIG. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 7,5%. 1) Patrones de peso molecular; 2) Aplicado a la cromatografía de hidrofobicidad; 3) β -gal purificada por hidrofobicidad.

altamente valioso en el caso de esta enzima por su carácter lábil, el ahorro de equipos y que brinda igualmente un producto de altísima calidad.

Por otra parte, es un procedimiento que se puede escalar sin dificultad, ya que este gel permite la utilización de altos flujos de operación.

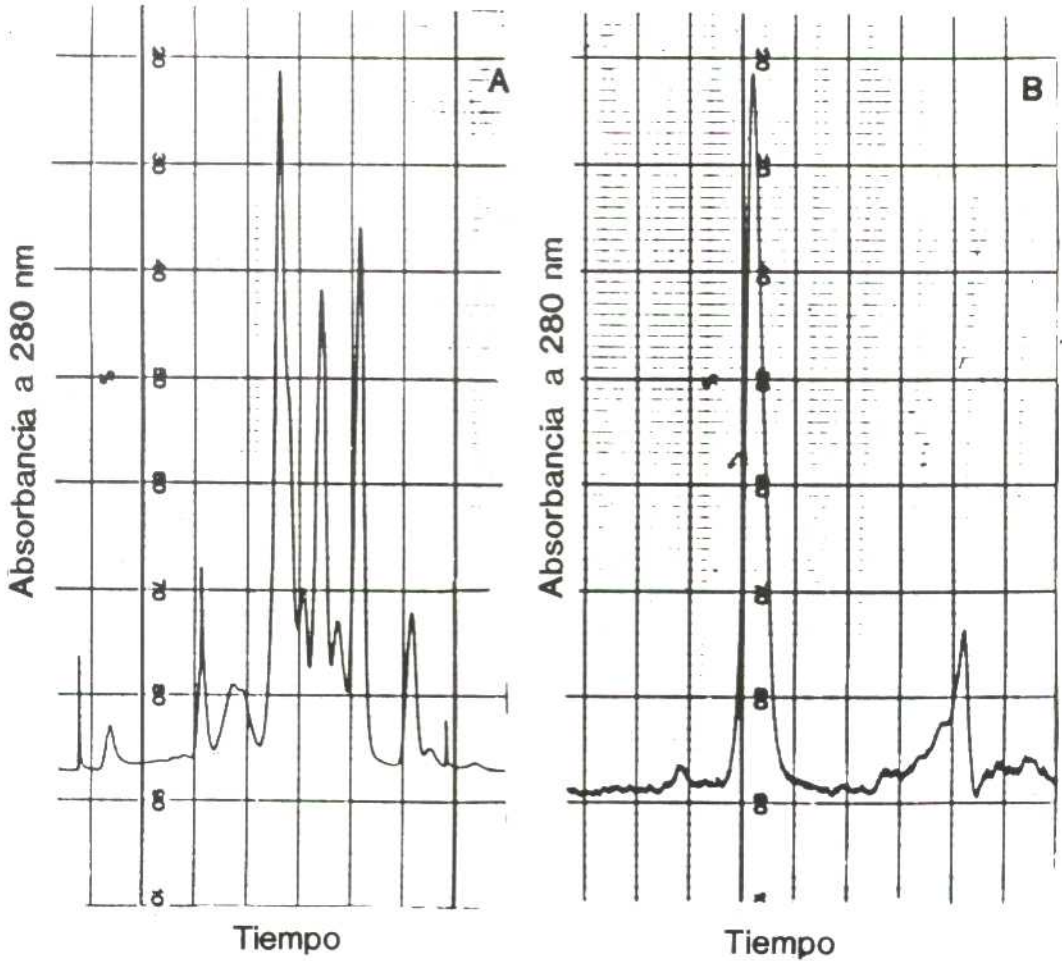


FIG. 6. Perfiles cromatográficos obtenidos al pasar por HPLC gel filtración: A) el aplicado a la cromatografía de hidrofobicidad; B) similar al de la figura 1A.

REFERENCIAS

- AGRAZ, A.; E. PENTON; M. ARAÑA y L. PEREZ (1988). Purificación de β -galactosidasa recombinante y su evaluación como enzima marcadora en un sistema inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología* 6: 22-31.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- GOHEEN, S. C. y S. C. ENGELHORN (1984). Hydrophobic interaction High-performance liquid chromatography of proteins. *Journal of chromatography* 317: 55-65.
- HUBER, R. E.; A. V. FOWLER e I. ZABIN (1982). Inactivation of β -galactosidase by iodination of tyrosine-253. *Biochemistry* 21: 5052-5055.
- LAEMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MILLER, H. (1972). Experiments in Molecular Biology. *Cold Spring Harbor Lab.*, pp. 398-403.
- SHALTIEL, S. (1983). Hydrophobic chromatography and its relevance to biological recognition. Affinity chromatography and biological recognition. *Academic Press*, pp. 229-239.
- SHALTIEL, S. (1984). Hidrophobic chromatography. *Methods in Enzymology* 104: 69-96.
- ULLMAN, A. (1984). One-step purification of hybrid proteins which have β -galactosidase activity. *Gene* 29: 27-30.