

PURIFICACIÓN DE LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN *Nco* I LIBRE DE EXONUCLEASAS Y ENDONUCLEASAS CONTAMINANTES

Raysa Vázquez, Duniesky Martínez, Giovany Reyes,
Gabriel Márquez, Nuria Reyes, Yaquelin Díaz, Manuel Luis,
Belkis González y Nubia González

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162,
C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Introducción

Las endonucleasas de restricción son proteínas que reconocen y cortan secuencias específicas de la molécula de ADN, por lo que constituyen instrumentos indispensables y eficaces en el desarrollo de las técnicas de ADN recombinante, permitiendo la expresión de proteínas de interés a partir de diferentes fuentes (células de bacteria, levaduras y organismos superiores); extendiéndose su uso a estudios de secuenciación, mapeo genético, interacción ADN-proteína, diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas y otros.

La endonucleasa de restricción *Nco* I, procedente del microorganismo *Rhodococcus ruber*, reconoce una secuencia hexanucleotídica palíndroma en la molécula de ADN, y su secuencia de corte y sitio de reconocimiento son:



Materiales y Métodos

60 g de biomasa del microorganismo *Nocardia coralina* se resuspenden en 120 mL de buffer A que contiene: 10 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol y 0,05 mM PMSF pH= 7,5, se le añade lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incuba 30 min en hielo. El lisado se rompe por dos pases de prensa francesa a 1 500 Kgf/cm^2 y se homogeniza con dos ciclos de ultrasonidos de 30 seg cada uno. El debris celular es separado por ultracentrifugación a 37 000 rpm durante 1 h. Al sobrenadante se le añade NaCl a una concentración final de 200 mM, y se chequea actividad enzimática incubando diferentes unidades con 1 μ g de λ ADN en buffer de reacción: 20 mM Tris-acetato, 10 mM Acetato de magnesio, 50 mM Acetato de potasio y 1 mM de DTT a pH= 7,9. Los ácidos nucleicos son separados añadiendo una solución de PEI al 1 % de concentración final seguido por la precipitación de proteínas con diferentes cortes de amonio, al 25 % y al 50 % donde precipita nuestra proteína de interés.

La muestra es aplicada a una resina intercambiador aniónico (DE52). Las proteínas no adsorbidas se lavan con 400 mL del buffer A. Se eluyen las pro-

teínas adsorbidas seguidas de un gradiente lineal de sales. Las fracciones con actividad enzimática son detectadas haciendo diluciones 1/5 de cada fracción, detectando contaminación con nucleasas inespecíficas empleando incubación con pGB90 y λ ADN. Las fracciones que no degraden ni transformen el material comparadas con el control negativo se precipitan al 70 % de saturación con $(NH_4)_2SO_4$. Se desalinizan usando una columna PD10 (G-25) y el eluato se aplica a una columna intercambiador catiónico (P11). Las fracciones con actividad hasta 1/5 se chequean para detectar contaminación con nucleasas inespecíficas comparándolas con un control negativo. Las fracciones finales se unen y se concentran contra el buffer de almacenamiento que contiene 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; 50 mM KCl; 1 mM DTT y BSA acetilada libre de nucleasas 200 μ g/mL.

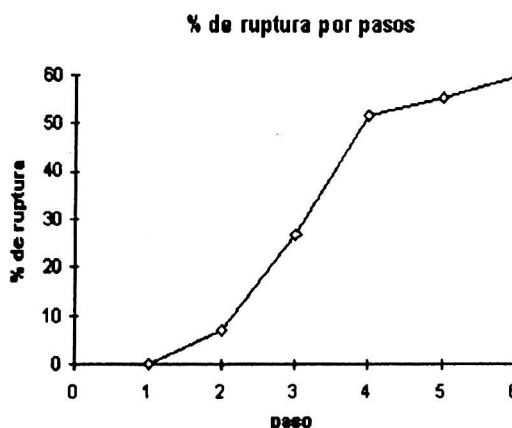
Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de ruptura celular alcanzado convinando diferentes métodos. El valor logrado con la lisozima es de un 7 %, la acción de la prensa francesa tiene gran importancia, en el primer pase la eficiencia de ruptura es de 26 %, y con el segundo de 51 %, siendo este el método más efectivo para la ruptura celular. Estos resultados demuestran la efectividad del proceso de disrupción utilizado.

1. Brooks J. Properties and uses of restriction endonucleases, *Methods in Enzymology*, 152, Beyer and Kimmel, Academic Press Inc., USA 1987.

2. Harris E, Angel S. Protein purification methods a practical approach 1992;87-90.

3. Roberts R. Restriction enzymes and their isochizomers. *Nucleic Acids Research* 17 Supplement 1989;347-387.



Con este protocolo se estableció la purificación de dicha enzima, obteniéndose muy buenos resultados. La precipitación de ácidos nucleicos y posteriormente la precipitación de proteínas brindan un buen aporte a la purificación quitando gran cantidad de trazas de proteínas contaminantes las cuales no interfieren posteriormente en la cromatografía de alta

resolución. Como se puede observar en la Tabla 1 se obtiene un grado de purificación final de 118 veces, con una actividad específica de 16 304 U/mg y un rendimiento del 14 %. Se obtuvo una preparación final con una actividad de 15 U/ μ L, libre de endonucleasas (más de 120 pores de sobredigestión) y libre de exonucleasas inespecíficas.

Tabla 1.

Etapa	Act. tot. (U)	Prot. tot (mg)	Act. esp. (U/mg)	Rendim. (%)	G de purif. (veces)
Ext. crudo	550 000	4 028,0	136	100,0	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (50 %)	440 000	711,5	619	85,2	4,6
DE -52	130 000	66,0	1 970	40,3	14,6
Ccnc. y desalado	100 000	38,2	2597,4	31,0	19,09
Bio-Rex 70	75 000	4,6	16 304	14,0	118,6



**Curso Internacional Teórico-Práctico
Inmunología y Patogénesis de *Neisseria meningitidis***

2-13 de Diciembre de 1996

*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología,
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa,
Ciudad de La Habana, Cuba*

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se complace en invitarle a participar en el curso internacional teórico-práctico de inmunología y patogénesis de *Neisseria meningitidis*, que se impartirá del 2 al 13 de diciembre de 1996 en las instalaciones del CIGB, C. Habana, Cuba. Este curso (40 h de clases teóricas y 20 h de clases teórico-prácticas) pretende dar una visión actualizada del estado de las investigaciones en el tema de la meningitis meningocócica, así como de las técnicas de biología molecular avanzada que sirven de herramienta fundamental en este trabajo. Además, propiciará el intercambio de conocimientos y experiencias entre los investigadores dedicados a esta rama, fundamentalmente en los países de América Latina.

Los temas del curso comprenden, entre otros: microbiología clínica e inmunología; epidemiología y diagnóstico; biología molecular de los principales antígenos de la membrana externa; vacunas; modelos animales para la enfermedad meningocócica.

El curso tendrá una matrícula máxima de 30 estudiantes. La cuota de inscripción es de 620 USD, que asegura alojamiento por 12 noches, desayuno, almuerzo y comida, actividades sociales de bienvenida y clausura, así como el material didáctico del curso.

**Dirigirse a: Lic. Tania Carmona; Dr. Ricardo Silva;
Dr. Gerardo Guillén**

Div. Vacunas, CIGB, C. Habana, Cuba. Teléfonos: (53-7) 218466, 218008.

Fax: (53-7) 218070, 336008. Tlx.: 512330 ingen cu.

Cable: P.O. BOX 6162.

E-mail: guillen@ingen.cigb.edu.cu