

COMUNICACIÓN CORTA

Aislamiento y caracterización preliminar de la proteína codificada por el ORF112 del fago VGJ ϕ de *Vibrio cholerae*

Alina Falero, Andy Caballero, Yovanny Izquierdo, M. Emilia Hervé, Rafael Fando y Javier Campos

Filiación: Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158 Cubanacán Playa, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: alina.falero@cnic.edu.cu

Recibido: 21 de mayo de 2008. Aceptado: 20 de agosto de 2008.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, fago VGJ ϕ , proteína Orf112, ADN cadena simple.
Key words: *Vibrio cholerae*, VGJ ϕ phage, protein Orf112, single stranded DNA.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*).¹ Se han descrito varios bacteriófagos filamentosos que infectan a esta bacteria, de los cuales el más estudiado es el fago CTX ϕ , que desempeña un papel crucial para la patogenicidad de *V. Cholerae*, ya que contiene los genes que codifican la toxina colérica.²⁻⁴ CTX ϕ también es de interés por su papel en la transmisión horizontal de genes (THG), ya que aunque normalmente se encuentra integrado en el genoma de las cepas toxigénicas de *V. cholerae*, puede pasar a la forma replicativa y transmitir potencialmente los genes de la toxina a cepas ambientales no patogénicas y convertirlas en virulentas.² Incluso podría transmitir los genes a otras especies bacterianas, pues se ha demostrado *in vitro* que, aunque con una baja frecuencia, CTX ϕ puede infectar a *Vibrio mimicus*.⁵ Otro fago filamentosos de interés por su papel en la THG es el VGJ ϕ , el cual recombina su genoma con el del CTX ϕ y forma un fago híbrido con mayor poder de infectividad que este último, puesto que utiliza un receptor mucho más ubicuo entre las cepas ambientales de *V. cholerae* comparado con el receptor de CTX ϕ .^{6,7} Es por ello que el estudio de estos fagos es de gran importancia para comprender cómo opera la THG en el ambiente.

En las células de *V. cholerae* infectadas por VGJ ϕ se observa una proteína que se expresa en mayor cantidad que el resto de las proteínas celulares detectable mediante SDS-PAGE.⁷ Un análisis de ella por espectrometría de masas reveló que correspondía con la proteína codificada por el marco de lectura abierto ORF112 de VGJ ϕ sin la metionina inicial y que tenía una masa molecular de 12,72 kDa.⁷ Debido a que el ORF112 es similar, en cuanto a tamaño y posición relativa dentro del genoma, a genes que codifican proteínas de unión a ADN de cadena simple (ADNcs) de otros fagos filamentosos descritos, se ha sugerido que el ORF112 realiza una función similar en el ciclo de vida de VGJ ϕ .⁴

Para estudiar la función de la proteína codificada por el ORF112 se requiere la obtención de esta con un elevado grado de pureza. Para tales fines, en este trabajo se ha desarrollado un protocolo de purificación basado en electroforesis preparativa bajo condiciones

desnaturalizantes (SDS-PAGE) con un paso previo de precipitación salina y renaturalización posterior de la proteína. Como resultado de este protocolo, se obtuvo la proteína del ORF112 con un 100 % de pureza y biológicamente activa.

Para la purificación de la proteína, la cepa *V. cholerae* 569B (Serogrupo O1, biotipo clásico Inaba) se infectó con una suspensión de partículas virales de VGJ ϕ como ha sido descrito anteriormente.⁷ Las células bacterianas de 569B infectadas se inocularon en 300 mL de caldo LB y se cultivó en zaranda durante una noche a 200 r/m y 37 °C. Simultáneamente, se inoculó en las mismas condiciones, como control negativo, la cepa 569B sin infectar. La expresión de la proteína del ORF112 se comprobó mediante SDS-PAGE por el perfil proteico de lisados celulares completos de alicuotas de los cultivos sin infectar e infectado con el fago VGJ ϕ . En este último, se detectó una banda de tamaño molecular aparente de aproximadamente 13 kDa (Fig.1 carril 3) que no se observó en el cultivo sin infectar (Fig.1 carril 2). Esta talla se correspondió con la de la proteína del ORF112 de *V. cholerae* calculada anteriormente por espectrometría de masas (12,72 kDa).⁷

Una vez comprobada la expresión, el cultivo crecido de 569B infectado se centrifugó durante 15 min a 6 000 r/min a 4 °C y el sedimento celular se lavó con Tris-HCl 15 mmol/L; pH 7,5. Las células fueron colectadas nuevamente por centrifugación durante 15 min a 6 000 r/min, 4 °C y resuspendidas en 15 mL de disolución estabilizadora Tris-HCl 15 mmol/L; pH 7,5. La suspensión se expuso a diez ciclos de 30 s en un desintegrador ultrasónico, seguido de 30 s de incubación en baño de hielo. Los pasos subsiguientes del proceso se realizaron entre 0 y 4 °C. El extracto celular se centrifugó durante 40 min a 9 000 r/min. Las fracciones celulares obtenidas tras la ruptura ultrasónica y la centrifugación fueron evaluadas mediante SDS-PAGE (Fig.1 carriles 4 y 5). La proteína del ORF112 se localizó en la fracción soluble de los extractos, lo que posibilitó un paso previo de semipurificación, mediante un gradiente de precipitación salina. Se empleó sulfato de amonio al 30 % de saturación en agitación magnética durante 1 h a 4 °C para la precipitación de

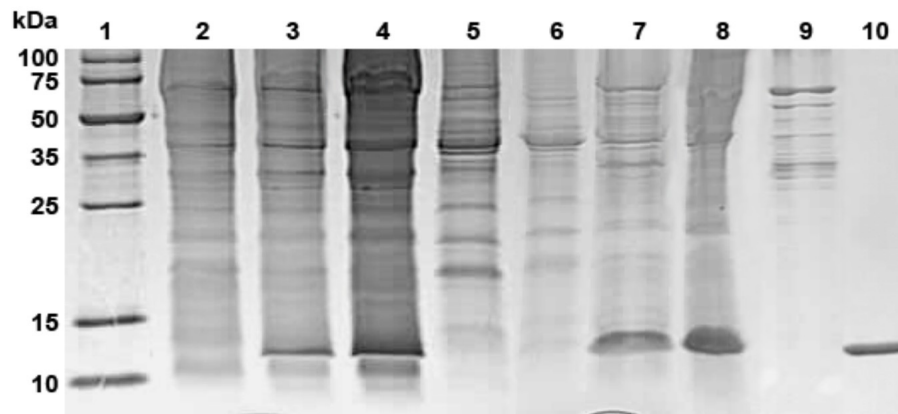


Fig. 1. Análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación de la proteína del ORF112. Carril 1, patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega, EE. UU.). Carriles 2 y 3, cultivos de la cepa 569B no infectado e infectado con el fago VGJφ, respectivamente. Carriles 4 y 5, fracciones soluble e insoluble del sonicado de 569B-VGJφ. Carriles 6 y 7, fracciones insoluble y soluble de la precipitación con sulfato de amonio al 30 %. Carriles 8 y 9, fracciones insoluble y soluble de la precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación. Carril 10, Orf112 purificada por SDS-PAGE preparativa.

proteínas contaminantes. ORF112 precipitó con 50 % de saturación de la disolución de sulfato de amonio, quedando en el sobrenadante otras proteínas contaminantes (Fig.1 carriles 6-9). Los pasos de precipitación fueron acompañados de centrifugación a 9 000 r/min durante 40 min a 4 °C . El precipitado obtenido con 50 % de saturación fue lavado dos veces por resuspensión en disolución sulfato de amonio de igual concentración y finalmente resuspendido en 5 mL de disolución estabilizadora Tris-HCl 15 mmol/L; pH 7,5. El extracto fue desalinizado por cromatografía en sephadex G-25 y eluído con Tris-HCl 15 mmol/L; pH 7,5. Dicho extracto se aplicó a una SDS-PAGE a escala preparativa (gel de 17 cm X 19 cm X 0,5 cm) al 15 % de poliacrilamida, con una intensidad de corriente constante de 100 mA y voltaje libre a 4 °C hasta la salida del colorante. Las bandas fueron visualizadas mediante tinción negativa del gel por el método del zinc-imidazol.⁸ La banda correspondiente a la proteína del ORF112 fue cortada del gel, fragmentada e introducida en una bolsa de diálisis de corte de masa molecular 6 a 8,000 kDa con 10 mL de disolución estabilizadora Tris-HCl 24 mmol/L, glicina 250 mmol/L y 0,5 % de SDS. Se electroeluyó empleando la misma disolución estabilizadora durante 5 h con una intensidad de corriente constante de 70 mA y voltaje libre a 4 °C . La bolsa de diálisis fue sometida durante 5 min a corriente inversa para despegar la proteína adherida de la membrana y se desecharon los fragmentos del gel. Se dializó contra 1 L de disolución estabilizadora Tris-HCl 0,5 mol/L, glicina 0,25 mol/L, pH 7,5 durante 24 h a 4 °C con agitación. Posteriormente, se repitió el proceso de diálisis con disolución estabilizadora Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L, pH 7,5 durante 24 h con agitación a 4 °C. La cantidad de proteína del extracto dializado se evaluó por el método de Lowry⁹ y se analizó por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15 %, en el que se aplicaron 2 µg de la proteína (Fig. 1, carril 10). Las bandas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie y analizadas por densitometría para determinar talla molecular y pureza, mediante el procesador de imágenes *Gene Tools Bioimage system* (*Syngene*). Se observó una sola banda con la talla molecular esperada de aproximadamente 13 kDa.

La actividad biológica del extracto se determinó mediante un ensayo de retardo en electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,5 % en disolución estabilizadora Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 20 mmol/L (TAE). Para el ensayo de unión de ORF112 al ADNcs se mezclaron 6 µg de ella con 225 ng de ADNcs del fago VEJφ en disolución estabilizadora Tris-HCl 20 mmol/L, glicerol 20 %, EDTA 10 mmol/L, BSA 0,3 µmol/L y un volumen final de 40 µL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min, se aplicó al gel y se corrió empleando un voltaje constante de 90 V a 4 °C hasta la salida del colorante. Se utilizó bromuro de etidio (1 µg/mL) para visualizar el ADN mediante la incidencia de luz UV en un transiluminador FBTIV-88 (Fisher, EE. UU.)

Para demostrar que la actividad de retardo del ADNcs se debió a la presencia de la proteína ORF112, se evaluó la actividad de ésta, después de haber sido inactivada con fenol/cloroformo 1 : 1 (v/v) (Fig. 2 carril 3). Se observó una marcada diferencia entre ambas muestras ya que la muestra después de tratada no exhibe actividad de retardo del ADNcs.



Fig. 2. Actividad biológica de la proteína del ORF112 sobre la movilidad electroforética del genoma de simple cadena del fago VGJφ en gel de agarosa al 0,5 % en disolución amortiguadora de pH TAE. Carril 1, ADNcs en ausencia de ORF112. Carril 2, ADNcs en presencia de ORF112 purificada por SDS-PAGE preparativa. Carril 3, igual que la anterior, pero tratada con fenol-cloroformo.

CONCLUSIONES

El protocolo de purificación basado en electroforesis preparativa bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), previa precipitación salina, permitió obtener la proteína del ORF112 biológicamente activa con un 100 % de pureza. Se informa por primera vez la purificación de la proteína codificada por el ORF112 y se demuestra su capacidad de unión al ADNcs genómico del fago VGJ ϕ , función esencial en el ciclo biológico de los fagos filamentosos. Por tanto queda demostrado el carácter de gen del ORF112, por lo que se propone nombrar a este de ahora en adelante *gV^{VGJ ϕ}* , para seguir la denominación usual de los fagos representativos del género Inovirus como el M13. En estos fagos el gen que codifica la proteína de unión a ADNcs se ha denominado gen V (*gV*) y la proteína codificada por este pV.

BIBLIOGRAFIA

1. Val M.E., Bouvier M., Campos J., Sherratt D., Cornet F., Mazel D. and Barre FX. The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio cholerae*. **Molecular Cell**, **19**, 559-566, 2005.
2. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1914, 1996.
3. Maiti D., Das B., Saha A., Ranjan K. Nandy G. Balakrish N. and Rupak K.B. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. **Microbiology**, **152**, 3633-3641, 2006.
4. Davis B.M. and Waldor M.K. Filamentous phages linked to labeled probe, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, virulence of *Vibrio cholerae*. **Curr. Opin. Microbiol.**, **6**, 35-42. 2003.
5. Faruque S.M., Rahman M.M., Asadulghani K.M. Islam N. and Mekalanos J.J. Lysogenic Conversion of Environmental *Vibrio mimicus* Strains by CTX ϕ . **Infection and Immunity**, **67**, 5723-5729, 1999.
6. Campos J., Fando R., Silva A., Rodriguez B.L. and Benitez J.A. Replicating function of the RS1 element associated with *Vibrio cholerae* CTX phi prophage. **FEMS Microbiol. Lett.**, **164**, 141-147, 1998.
7. Campos J., Martinez E., Suzarte E., Rodriguez B.L., Marrero K., Silva Y. *et al.* VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. **J. Bacteriol.**, **185**, 5685-5696, 2003.
8. Castellanos-Serra L. and Hardy E. Detection of biomolecules in electrophoresis gels with salts of imidazole and zinc II: a decade of research. **Electrophoresis**, **22**, 864-873, 2001.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**, 265-275, 1951.