

## COMUNICACIÓN CORTA

# Método cromatográfico no desnaturizante para la purificación de la proteína de unión a ADN de cadena simple pV del fago VGJΦ de *Vibrio cholerae*

**Andy Caballero, Alina Falero y Laura Jiménez.**

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: andy.caballero@cnic.edu.cu

Recibido: 16 de enero de 2009.

Aceptado: 11 de mayo de 2009.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, fago VGJΦ, proteína pV<sup>VGJΦ</sup>, purificación cromatográfica.  
Key words: *Vibrio cholerae*, VGJΦ phage, pV<sup>VGJΦ</sup> protein, chromatographic purification.

VGJΦ es un bacteriófago filamentosos específico de la bacteria *Vibrio cholerae* cuyo virión tiene un genoma de ADN monocatenario circular.<sup>1</sup> En la bacteria infectada, el ADN de doble cadena de la forma replicativa sirve de molde para sintetizar la cadena nucleotídica positiva destinada a ser el genoma de una nueva partícula viral.<sup>1</sup> A diferencia del ADN dúplex que confiere estabilidad y protección a ambas cadenas nucleotídicas,<sup>2</sup> el ADN monocatenario es más susceptible a la acción de las nucleasas intracelulares<sup>3</sup> y usualmente, se protege por interacción con proteínas de unión a ADN de cadena simple (PUAcs).<sup>4</sup>

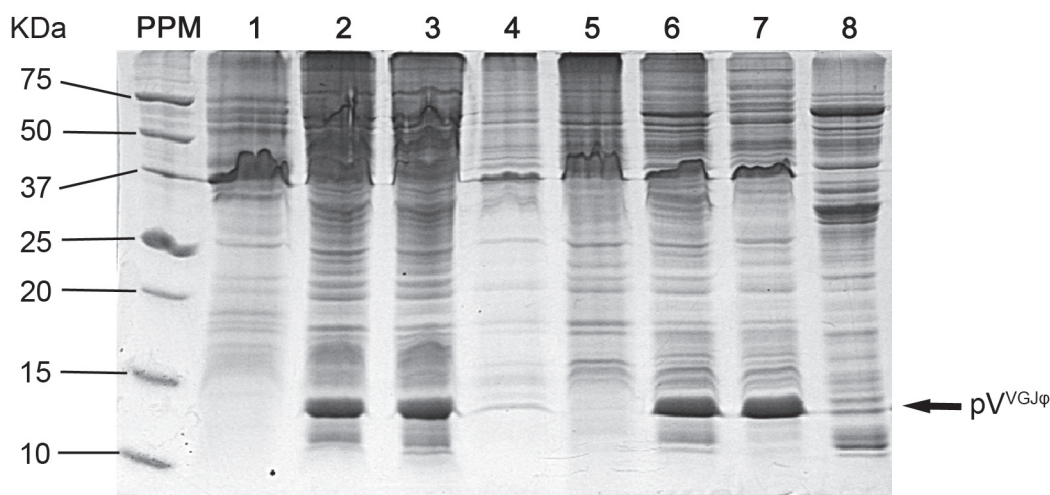
Las PUAcs, por el papel que desempeñan en el metabolismo del ADN, son proteínas muy ubicuas.<sup>5</sup> Ellas se encuentran en los tres principales grupos en que se considera subdividida la diversidad de los seres vivos: arqueas,<sup>6</sup> bacterias<sup>7</sup> y eucariontes.<sup>8</sup> Independientemente de los tres dominios, las PUAcs se han aislado de virus, como los adenovirus<sup>9</sup> y bacteriófagos.<sup>10</sup> De hecho, el primer ejemplo de esta importante familia de proteínas fue descrito en el fago T4.<sup>10</sup>

La comparación de la secuencia del genoma de VGJΦ con el mapa génico de otros fagos filamentosos, mostró que el gen *orf112* es un homólogo de posición de los genes codificantes de la proteína V (pV) que funcionan como PUAcs en otros bacteriófagos.<sup>1</sup> La secuenciación del extremo amino-terminal y la identificación por Espectrometría de Masas reveló que una especie proteica soluble de ~13 kDa del citoplasma de *V. cholerae* infectado con VGJΦ correspondía con la del producto hipotético del gen *orf112* del fago.<sup>1</sup> Falero y cols.<sup>11</sup> purificaron esta proteína mediante SDS-PAGE (del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) a escala preparativa. La proteína renaturalizada retardó, en gel de agarosa, el ADN monocatenario de la forma infectiva de VGJΦ, lo cual demostró la actividad de PUAcs de ella.<sup>11</sup> Sin embargo, el proceso de purificación

desnaturizante por SDS-PAGE preparativa tiene serios inconvenientes para su generalización y requiere cierta habilidad o pericia. Por esto, fue de interés investigar un procedimiento más simple y no desnaturizante que permitiera obtener la proteína en su estado nativo.

En el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, se diseñó un nuevo procedimiento de purificación para obtener la proteína pV<sup>VGJΦ</sup> nativa. Este comprende tres etapas: clarificación, fraccionamiento inicial y purificación definitiva. En la segunda, se utilizaron las matrices cromatográficas DEAE-Sepharose CL-6B y Blue-Sepharose CL-6B y en la tercera, Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow; todas de Amersham Bioscience.

La expresión de la proteína pV<sup>VGJΦ</sup> se realizó a partir de la cepa 569B (serogrupo: O1, biotipo: clásico, serotipo: Inaba) de *V. cholerae* infectada con el fago VGJΦ.<sup>1</sup> La biomasa celular colectada por centrifugación se rompió por desintegración ultrasónica. El lisado celular se clarificó mediante centrifugación y precipitación fraccionada con sulfato de amonio.<sup>11</sup> Brevemente, la cepa 569B de *V. cholerae* se cultivó en placas de Petri sobre medio de cultivo sólido de Luria Bertani durante toda una noche a 37 °C. Dos asadas del cultivo se inocularon independientemente en 5 mL de caldo de Luria Bertani (LB líquido) en tubo de ensayo y se incubaron a 37 °C durante una h, agitados en zaranda orbital con control de temperatura a 200 r/min. Un precultivo se inoculó con una suspensión de partículas del fago VGJΦ y el otro no; ambos se incubaron durante 6 h a 37 °C en zaranda orbital con control de temperatura con agitación de 200 r/min. Seguidamente, 1 mL de cada precultivo se inoculó en 300 mL de LB líquido en erlenmeyer de 1 mL y se incubó a 37 °C durante toda una noche en zaranda con control de temperatura con agitación de 200 r/min. Se tomó una alícuota de 20 µL de los cultivos crecidos para análisis por SDS-PAGE (Fig. 1, carriles 1 y 2).



**Fig. 1.** Análisis por SDS-PAGE del lisado celular obtenido por desintegración ultrasónica y del clarificado mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio. PPM. Patrón de peso molecular (Bio-Rad). Carriles 1 y 2. Cepa 569B de *V. Cholerae* no infectada e infectada con VGJΦ, respectivamente. Carriles 3 y 4. Fracciones soluble e insoluble, respectivamente de la ruptura celular mediante desintegración ultrasónica. Carriles 5 y 6. Fracciones insoluble y soluble, respectivamente, de la precipitación con sulfato de amonio al 30 % de saturación de la fracción soluble del lisado celular. Carriles 7 y 8. Fracción insoluble y soluble respectivamente de la precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación de la fracción soluble de la precipitación al 30 %.

El cultivo de la cepa 569B infectada se centrifugó durante 15 min a 6 440 g a 4 °C y el sedimento celular se lavó con una disolución estabilizadora de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7,0 (disolución estabilizadora A). Las células fueron colectadas nuevamente en frío (4 °C) por centrifugación durante 15 min a 6 440 g y resuspendidas en 15 mL de disolución estabilizadora A. La suspensión celular resultante se sometió a diez ciclos de un minuto de desintegración ultrasónica seguido de 30 s de reposo; todo en baño de hielo.

#### Clarificación

El lisado celular se centrifugó durante 40 min a 14 480 g a 4 °C. La fracción soluble se sometió a la precipitación con sulfato de amonio al 30 % de saturación en baño de hielo durante una hora con agitación magnética lenta. Se centrifugó durante 40 min a 14 480 g a 4 °C y se tomó nuevamente la fracción soluble y se sometió a la precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación de igual manera que al 30 %. Se centrifugó durante 40 min a 14 480 g a 4 °C y se desechó la fracción soluble. En cada paso, desde la lisis celular hasta la clarificación, se retuvo una alícuota para análisis por SDS-PAGE (Fig. 1, carriles 3 a 8)

#### Fraccionamiento inicial

El precipitado se resuspendió en 4 mL de disolución estabilizadora A. Se ajustó la conductividad de la suspensión a la correspondiente de la disolución estabilizadora A (4,5 mS/cm) con agua destilada. Se equilibró una columna de DEAE-Sepharose CL-6B, de 20 mL de volumen de columna (Vc = 20 mL), con disolución estabilizadora A. Se aplicó la muestra a un flujo de 0,6 mL/min mediante el empleo de una bomba peristáltica Miniplus 2 (Gilson). Se lavó la columna con disolución estabilizadora A hasta que se recuperó la línea base del cromatograma. Se colectó la fracción de proteínas no unidas y se tomó una alícuota de 0,5 mL para análisis por SDS-PAGE (Fig. 2, panel C, carril 2).

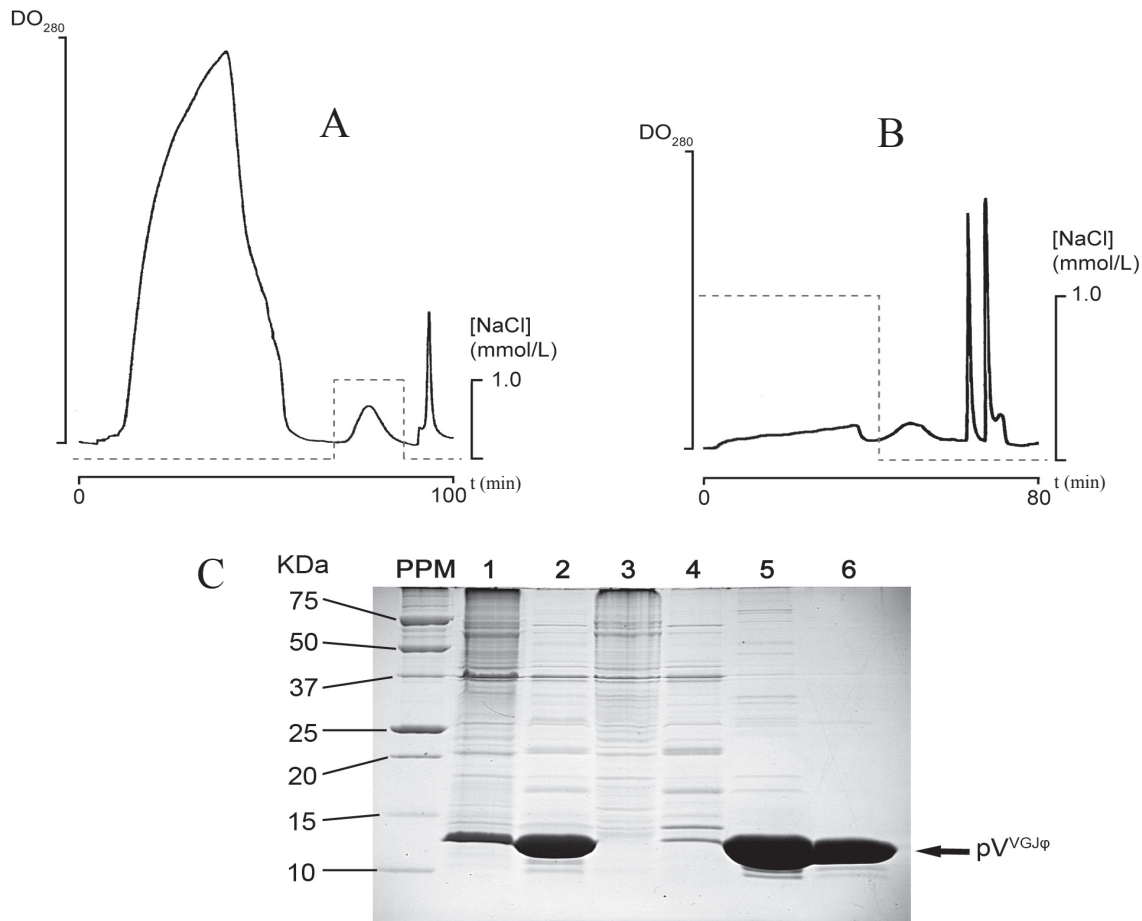
Se lavó la columna con fosfato de sodio 50 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,0 (disolución estabilizadora B) a 1,3 mL/min y se colectó la fracción correspondiente para análisis por SDS-PAGE (Fig. 2, panel C, carril 3).

#### Purificación definitiva

La fracción de proteínas no unidas colectada, se aplicó a una columna de Blue-Sepharose CL-6B (Vc = 10 mL) a 0,6 mL/min, previamente equilibrada con disolución estabilizadora A. Se lavó la columna con la misma disolución estabilizadora hasta recuperar la línea base del cromatograma. Se colectó la fracción de proteínas no unidas y se tomó una alícuota de 0,5 mL para análisis por SDS-PAGE (Fig. 2, panel C, carril 4). La proteína pV<sup>VGJΦ</sup> se eluyó con disolución estabilizadora B a 1,3 mL/min. Se colectó la fracción correspondiente y se tomó una alícuota de 0,5 mL para análisis por SDS-PAGE (Fig. 2, paneles A y C, carril 5). La columna se lavó con 2 Vc de NaOH 0,1 mol/L y se colectó la fracción correspondiente al último pico del cromatograma (Fig. 2, panel A). La SDS-PAGE de esta fracción no mostró la presencia de la proteína de interés.

Se equilibró una columna de Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Vc = 5 mL) con disolución estabilizadora B. Se aplicó a un flujo de 0,6 mL/min la elución de Blue-Sepharose CL-6B. Se lavó la columna con disolución estabilizadora B hasta recuperar la línea base del cromatograma. La proteína pV<sup>VGJΦ</sup> se eluyó con disolución estabilizadora A bajo un flujo de 1,3 mL/min y se tomó una alícuota de 0,5 mL para análisis por SDS-PAGE (Fig. 2, paneles B y C, carril 6). Se lavó la columna con agua destilada y seguidamente con NaOH 0,5 mol/L y se colectaron las fracciones correspondientes a los dos últimos picos del cromatograma (Fig. 2, panel B). En estas fracciones no se encontró remanente alguno de pV<sup>VGJΦ</sup> al analizarlos por SDS-PAGE.

La fracción colectada en la elución se concentró por ultrafiltración en atmósfera de nitrógeno gaseoso a 2,5 bar



**Fig. 2.** Análisis del proceso de purificación de la proteína  $pV^{VGJ\Phi}$ . Panel A: Perfil cromatográfico de la purificación de  $pV^{VGJ\Phi}$  en columna de Blue-Sepharose CL-6B. Panel B: Perfil cromatográfico de la purificación de  $pV^{VGJ\Phi}$  en columna de Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow. Panel C: SDS-PAGE de las fracciones colectadas en todo el proceso cromatográfico: PPM: Patrón de peso molecular (Bio-Rad). Carril 1. Muestra aplicada (sedimento de la precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación resuspendida) a DEAE-Sepharose CL-6B. Carril 2. Fracción de proteínas no unidas a DEAE-Sepharose CL-6B. Carril 3. Lavado de DEAE-Sepharose CL-6B con disolución estabilizadora B. Carril 4. Fracción de proteínas no unidas a Blue-Sepharose CL-6B. Carril 5. Elución de  $pV^{VGJ\Phi}$  de Blue-Sepharose CL-6B con disolución estabilizadora B. Carril 6. Elución de  $pV^{VGJ\Phi}$  de Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow con disolución estabilizadora A.

mediante un ultrafiltro (Amicon) empleando una membrana de corte de masa molecular de 10 kDa. La concentración final de  $pV^{VGJ\Phi}$  se estimó por el método de Lowry<sup>12</sup> y fue de aproximadamente 1,02 mg/mL en 3 mL.

Toda muestra tomada durante el fraccionamiento con sulfato de amonio y el procesamiento cromatográfico, se desaló o concentró o ambos, previo a la SDS-PAGE, mediante precipitación con metanol-cloroformo.<sup>13</sup> El gel para SDS-PAGE se preparó al 15 % (m/v), según Laemmli,<sup>14</sup> en condiciones no reductoras y las manchas proteicas se revelaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R (Sigma, cod B-0630). El grado de pureza fue estimado mediante el análisis densitométrico de los gels de SDS-PAGE, empleando el procesador de imágenes *Gene Tools Bioimage system* (Syngene). El grado de pureza obtenido fue del 95 %.

La purificación electroforética de  $pV^{VGJ\Phi}$  anterior a este trabajo<sup>11</sup> alcanzó más de un 99 % de pureza y un mayor rendimiento. Sin embargo, aquella proteína retuvo la mitad de la actividad específica de la obtenida mediante el método cromatográfico descrito en este

trabajo. En este sentido, es importante resaltar que el método electroforético somete a la proteína a condiciones que atentan contra su estabilidad estructural. Por esta razón, es necesario incluir además, un paso de renaturalización que toma la mitad del tiempo de la purificación (4 d). Durante este último paso, se emplean aditivos en grandes concentraciones (glicina 0,25 mol/L y Tris 0,5 mol/L) en grandes volúmenes (2 L) de disoluciones estabilizadoras. Esto, sumado a la toxicidad y cantidad de acrilamida empleada para alcanzar un gel de dimensiones preparativas, así como a las condiciones de temperatura controlada, encarecen innecesariamente el procedimiento.

Por otro lado, aunque el método cromatográfico permite obtener alrededor del 95 % de pureza, este no atenta contra la estructura nativa de la proteína, es más rápido, y más económico (Tabla 1). Es importante resaltar que, aunque el rendimiento es menor respecto a la purificación electroforética, aporta cantidad de proteína suficiente para los estudios de caracterización molecular que se desarrollan en el laboratorio.

**Tabla 1.** Comparación entre el método electroforético y cromatográfico de purificación de la proteína pV<sup>VGJφ</sup>.

Variable del proceso	Valor acorde con el método de purificación de pV <sup>VGJφ</sup> empleado	
	SDS-PAGE preparativa	Cromatografía
Duración	4 d	1 d
Instrumentos y materiales no fungibles	Zaranda orbital con control de temperatura, disruptor ultrasónico, fuente de corriente eléctrica, aparato de electroforesis, cámara fría.	Zaranda orbital con control de temperatura, disruptor ultrasónico, fuente de corriente eléctrica, columna y matrices cromatográficas, bomba peristáltica, detector UV y registrador.
Insumos y materiales fungibles	Medio de cultivo, sulfato de amonio; glicina, Tris y acrilamida para escala preparativa; saco de diálisis y hasta 2 L de otras disoluciones estabilizadoras.	Medio de cultivo, sulfato de amonio, fosfato y cloruro de sodio; hasta 0,5 L de disoluciones estabilizadoras.
Riesgo de toxicidad para el operador	Sí	No
Temperatura	4 °C	Ambiente
Desnaturalización proteica	Sí	No
Renaturalización proteica	Sí	No
Rendimiento relativo	1	~ 0,4
Actividad específica relativa	~ 0,5	1
Grado de pureza	100 %	93 a 98 %

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campos J, Martínez E, Suzarte E, Rodríguez BL, 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.* 2003;185(19):5685-5696.
- Brill SJ, Stillman B. Replication factor-A from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by three essential genes coordinately expressed at S phase. *Genes Dev.* 1991;5(9):1589-1600.
- Pant K, Karpel RL, Rouzina I, Williams MC. Salt dependent binding of T4 gene 32 protein to single and double-stranded DNA: single molecule force spectroscopy measurements. *J Mol Biol.* 2005; 349(2):317-330.
- Fedorov R, Witte G, Urbanke C, Manstein DJ, Curth U. 3D structure of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA-binding protein gives insight into the functioning of SSB proteins. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):6708-6717.
- Robbins JB, McKinney MC, Guzman CE, Sriratana B, Fitz-Gibbon S, Ha T *et al.* The euryarchaeota, nature's medium for engineering of single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15325-15339.
- Robbins JB, Murphy MC, White BA, Mackie RI, Ha T, Cann IK. Functional analysis of multiple single-stranded DNA-binding proteins from *Methanosarcina acetivorans* and their effects on DNA synthesis by DNA polymerase BI. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6315-6326.
- Filipkowski P, Duraj-Thatte A and Kur J. Identification, cloning, expression, and characterization of a highly thermostable single-stranded DNA-binding protein (SSB) from *Deinococcus murrayi*. *Protein expression and purification.* 2007;53:201-208
- Mumtsidu E, Makhov AM, Konarey PV, Svergun DI, Griffith JD and Tucker PA. Structural features of the single-stranded DNA-binding protein of Epstein-Barr virus. *Journal of Structural Biology.* 2008;161:172-187.
- Tucker PA, Tsernoglou D, Tucker AD, Coenjaerts FE, Leenders H, van der Vliet PC. Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding. *EMBO J.* 1994;13(13):2994-3002.
- Alberts BM, Frey L. T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. *Nature.* 1970;227(5265):1313-1318.
- Falero A, Caballero A, Izquierdo Y, Hervé M-E, Fando R, Campos J. Aislamiento y caracterización preliminar de la proteína codificada por el Orf112 del fago VGJ phi de *Vibrio cholerae*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2008;39(3):191-193.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
- Wessel D, Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 1984;138(1):141-143.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.