

03044
2es.

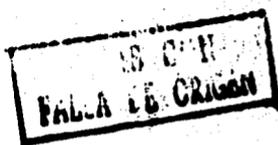
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL C.C.H.

"ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCION DE ENZIMAS
DE RESTRICCIÓN"
en el Centro de Investigación sobre Ingeniería
Genética y Biotecnología

Tesina para obtener el Diploma de
Especialista en Biotecnología

PRESENTA

Irma Vichido Báez





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La manipulación in vitro de DNA, requiere de varias herramientas entre las que destacan las enzimas de restricción y otras enzimas cuyo sustrato es ácido desoxiribonucleico (DNA). Estas proteínas reconocen secuencias específicas de nucleótidos, a los cuales cortan en la doble cadena de DNA. El mecanismo de reconocimiento es particularmente interesante porque características generales de estos procesos pueden aplicarse a las proteínas que interactúan con DNA.

Muchas de estas enzimas se encuentran disponibles comercialmente pero presentan el inconveniente de ser importadas y por lo tanto, son caras. Así cuando un planteamiento experimental requiere grandes cantidades de enzima(s) el factor económico pudiera ser el problema que restringiera el proyecto.

Estas enzimas son relativamente estables. El procedimiento para su preparación está publicado y disponible en revistas científicas. Roberts, R. (1977)

En el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética Biotecnología, se tiene la experiencia en la purificación de estas enzimas, ya que se han purificado de 8 a 10 de ellas y se han obtenido de 10,000 a 100,000 unidades de enzima pura a partir de 20 g de células. Sin embargo aún se compran varias enzimas.

El poder integrar una colección de diversas enzimas de restricción permitirá al Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, reducir una buena parte del presupuesto

que se tiene destinado a la compra de estas enzimas y poderlo utilizar en otros rubros; por otro lado esto debería aumentar el número de experimentos a realizar por el personal académico de la Institución. Este ha sido uno de los objetivos de este trabajo.

Además de las endonucleasas de restricción, existen otras enzimas que juegan un papel importante en el manejo "in vivo" e "in vitro" de DNA, y que permiten recombinar "in vitro" material genético de orígenes muy diferentes.

La enzima ligasa de DNA, codificada por el bacteriófago T4, (que tiene la capacidad de formar la unión covalente entre un extremo 5'-fosfato y uno 3'-oxhidrilo, hidrolizando ATP para obtener la energía que la reacción requiere) es una de éstas . Esta enzima es capaz de unir o "ligar" DNAs de diferentes orígenes en forma covalente, formando "moléculas híbridas". Una característica importante de esta enzima es que es capaz de unir fragmentos con extremos cohesivos, así como fragmentos con extremos rasos, es decir sin que medie el apareamiento de bases (Sgarbella et al, 1977)

Otras enzimas cuyo sustrato es DNA , han sido usadas principalmente para modificar los extremos de esta molécula y para obtener DNA marcado con isótopos radiactivos . Podemos citar las polimerasas de DNA, cinasas de DNA, exonucleasas, nucleasa S1 etc. Sería deseable poder purificar y mantener una provisión de estas enzimas para disminuir el costo y el tiempo de realización de experimentos en Ingeniería Genética en el Centro.

I N T R O D U C C I O N

La Ingeniería genética, también llamada manipulación Genética y Clonación Molecular del DNA, se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten introducir un segmento de DNA específico de cualquier origen en una bacteria asegurando su permanencia dentro de ella a través de integrarlo a un vehículo molecular (molécula de DNA extracromosomal que se replica independientemente del cromosoma) fig.1

Una de las limitaciones que ha existido para el estudio el genoma, ha sido su enorme tamaño y la estructura simple y repetitiva de sus 4 nucleótidos que constituyen el DNA. El estudio de secuencias específicas de DNA era una tarea que entrañaba serias dificultades técnicas y era solo realizable en algunos casos específicos y generalmente sencillos (Brown, D 1973 Gilbert, W and Maxam, A. 1973 y Dickson et al 1975)

El descubrimiento en 1970 de una enzima que hidrolizaba el DNA en sitios específicos (reconociendo una cierta secuencia dentro de la molécula) por Smith et al y la utilización de ésta para el estudio del DNA del virus SV40 (Donna, K. and Nathans, D. 1972) establecieron el primer paso en el camino para obtener fragmentos específicos de DNA.

A partir de esa fecha, la búsqueda de enzimas similares ha fructificado en el hallazgo de una gran cantidad de enzimas de restricción que reconocen diferentes secuencias de nucleótidos que permiten gran versatilidad en el fraccionamiento del DNA (Roberts, R. 1976)

Vehículo-Plásmido

DNA Heterólogo

Sitios
Endonucleasa
Restricción

Rompiendo con
Endonucleasa

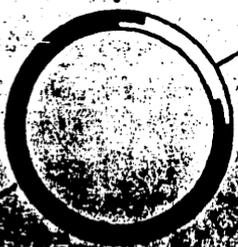
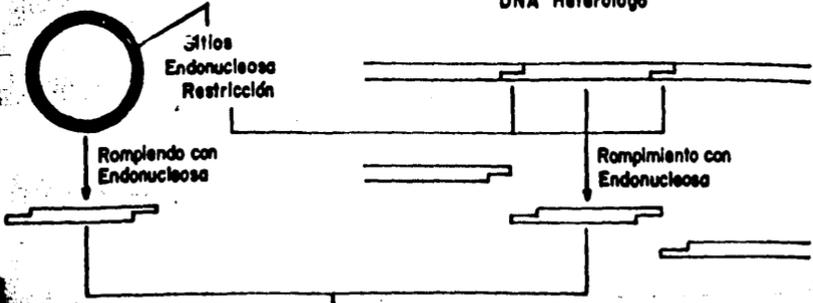
Rompiendo con
Endonucleasa

Alineamiento
y
Repegar (ligasa)

Pasajero

Transformación

Clonación en E. coli



Clonación en E. coli

Estos hallazgos establecieron una frontera en el estudio del material genético porque permiten el fraccionamiento específico, en forma reproducible, de moléculas de DNA de cualquier organismo. Su uso comprende, el mapeo físico del genoma, análisis de secuencia nucleotídica, aislamiento de genes e ingeniería genética.

La forma más comúnmente usada para fragmentar el DNA es por medio de las llamadas endonucleasas de restricción, enzimas que cortan las uniones internas (enlaces covalentes fosfodiéster)

fig.2

Estas enzimas de acuerdo a su forma de actuar al cortar, se han clasificado en tres clases: I, II y III.

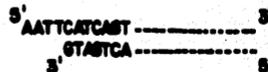
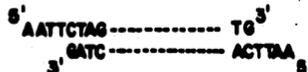
Las primeras son aquellas que cortan inespecíficamente, aunque podrían reconocer una secuencia específica. Las endonucleasas de la clase II, en cambio, reconocen secuencias específicas y cortan dentro de esa misma secuencia. Las de la clase III, reconocen secuencias específicas y cortan un cierto número de nucleótidos después de esta secuencia.

Evidentemente las más útiles son las de la clase II, las cuales pueden reconocer regiones específicas de 4, 5, 6, 7 u 8 pares de bases (p.b.). Estas secuencias de nucleótidos pueden formar generalmente un "palíndromo", es decir, una secuencia de doble hebra con simetría rotacional donde la secuencia nucleotídica



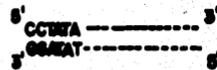
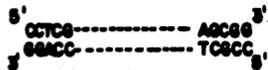
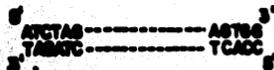
Digestión con Eae RI

Extremos cohesivos hélice sencilla 5'



Digestión con Hae III

Extremos resacados



Digestión con Pst I

Extremos cohesivos hélice sencilla 3'

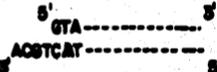
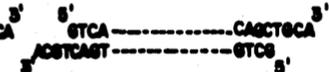
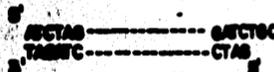


Figura 2. RECONOCIMIENTO Y CORTE DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE ADN, POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

se lee igual en ambas hebras en la dirección 5' a 3'.

Estas endonucleasas de la clase II se pueden subclasificar de acuerdo a su forma de corte.

Algunas cortan formando extremos cohesivos (hélice sencilla) que pueden ser 5'P saliente o 3' OH salientes, y otras cortan formando extremos rasos (doble hélice) fig. 2

El papel "in vivo" de las endonucleasas de restricción está íntimamente ligado al fenómeno de variación. Parece probable que la célula usa estas enzimas para protegerse de DNAs extraños (ej virus) que logren entrar en ésta, para lo cual, la célula requiere proteger su DNA usando una segunda enzima, enzima modificación, la cual se encarga de "modificar" la secuencia nucleotídica que es sustrato de la endonucleasa de restricción; esta modificación significa metilar la secuencia específica de la endonucleasa (modelo de restricción modificación) (Arber, W and Dussiox, D. 1962)

Ya que las endonucleasas tienen la propiedad de reconocer secuencias de 6,5y4 p.b. principalmente, lo cual corresponde probabilísticamente a cortar el DNA cada 4069, 1024 y 256 pb. respectivamente, el uso de estas enzimas se vuelve muy útil para caracterizar un fragmento de DNA dado. Cuando un DNA es hidrolizado con una endonucleasa de restricción éste es roto por varios fragmentos los cuales, al ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida, según su tamaño, forman una serie de bandas (patrón de restricción), el cual es característico de cada DNA tratado con esa endonucleasa. De esta manera se puede

obtener el mapa físico de un DNA, cuando no es muy grande, es decir, la posición relativa de los diferentes sitios de restricción (región de DNA cuya secuencia en pares de bases es específicamente reconocida por las endonucleasas de restricción) en ese DNA.

ANTECEDENTES

El descubrimiento de las endodeoxirribonucleasas sitio-especifico (endonucleasas de restricción) ha abierto nuevas posibilidades en el análisis de la estructura y función del DNA. El término enzima de restricción originado por observaciones genéticas fué definida como una enzima involucrada en un sistema de restricción-modificación (Roberts 1976).

Con la ingeniería genética se abre un nuevo campo en el cual se están logrando avances muy importantes en muchas áreas, los cuales han sido facilitados por la disponibilidad de estas enzimas.

En el laboratorio se ha tratado de introducir esta metodología de purificación de enzimas como una herramienta más en cuanto a las técnicas utilizadas en Ingeniería Genética Molecular, obteniéndose ya algunas de ellas las cuales han sido utilizadas experimentalmente en el laboratorio

Por otro lado, en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, estamos interesados en la identificación y caracterización de nuevas enzimas.

TECNOLOGIA DE PRODUCCION

La información tecnológica de la producción y del procedimiento de los datos de las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos para incrementar la productividad de las enzimas de restricción es escasa y no está

totalmente disponible en la literatura.

F U E N T E S

Las bacterias son la principal fuente de producción de endonucleasas de restricción . Han sido reportadas más de 600 enzimas de restricción con más de 100 especificaciones, enzimas similares son raras en eucariotes. Pareciera que las enzimas de restricción pueden tener diversos orígenes microbianos. Recientemente ha sido reportada una endonucleasa de restricción de origen humano HsaI (Lao,W.D. and Chen,S.Y.).

La enzima Eco RI es producida por la bacteria Escherichia coli RY 13 , así como por cepas que han sido modificadas con técnicas de ingeniería genética para sobreproducir la enzima .

La enzima FalI es producida por la bacteria Providencia alcalifaciens ATCC 9866

La enzima PstI es producida por una cepa de aislados clínicos , Providencia stuartii 164; así como por una cepa transformada de Escherichia colique lleva el gene PstI insertado en el vector de clonación pBR322.

Como se ha mencionado las enzimas de restricción son enzimas intracelulares producidas por microorganismos. En el caso de las bacterias, la cantidad de enzima que se produce varía considerablemente por ejemplo de 10 g de células de Haemophilus aegypticus se ha aislado suficiente enzima HaeIII como para digerir completamente 10 g de DNA de bacteriófago lambda, mientras que en otros casos resulta casi imposible aislar suficiente enzima para poder caracterizarla.

Por lo tanto para la purificación de las enzimas de restricción es muy importante seguir exactamente las condiciones de cultivo y el medio propuesto por los autores de los diferentes métodos de purificación reportados, ya que alteraciones en el medio de crecimiento puede disminuir la cantidad intracelular de la enzima de restricción deseada y aumentar las cantidades de otras endo ó exonucleasas así como las cantidades de enzimas proteolíticas, esto puede dar como resultado una dramática reducción en el rendimiento final de la enzima purificada.

Asimismo es importante seleccionar y/o adaptar un proceso de purificación con el cual se obtenga el mejor rendimiento.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción no han sido bien caracterizadas en términos de sus propiedades físico-químicas debido a que la mayor atención ha sido enfocada más a su uso

pH, TEMPERATURA Y ESTABILIDAD

El pH óptimo de actividad para la mayoría de las enzimas de restricción se encuentra del lado alcalino (alrededor de 7.5) con un valor máximo de 7.5 para algunas enzimas y un valor mínimo de 7.0 para otras. Algunas enzimas de restricción se ha encontrado que son estables a amplios rangos de pH.

Las enzimas de restricción de origen mesofílico poseen temperaturas óptimas de 37 C mientras que las de origen termofílico el rango de temperatura óptima que presentan es entre 50 a 67 C. Las enzimas de restricción que provienen de microorganismos termofílicos en general tienen mayor estabilidad térmica que aquellos que provienen de microorganismos mesofílicos.

REQUERIMIENTO DE IONES.

Todas las enzimas del tipo II requieren Mg + para su actividad y su requerimiento de concentración óptima es diferente para las diferentes enzimas. Alguna veces Mn + sustituye parcialmente al Mg + pero en altas concentraciones generalmente es inhibidor. Asimismo la actividad de algunas enzimas es inducida a cierta concentración de NaCl, sin embargo también es inhibitoria a diferentes concentraciones para ciertas enzimas.

VALORES DE Km, NUMERO DE RECAMBIO Y PUNTO ISOELECTRICO .

Es muy escasa la información disponible de estos valores para las enzimas de restricción.

PESO MOLECULAR.

Los pesos moleculares de algunas enzimas de restricción ya han sido determinados. Los rangos de las subunidades de PM varían desde 20,000 a 70 000 (Dubey et al)

Dentro de los productos biotecnológicos, las enzimas de restricción se encuentran dentro del segundo grupo (10 -6 cm -

ENZIMA	PM	REF.
<u>EcoRI</u>	30 000	(12)
<u>PstI</u>	35 000	(13)
<u>PaiI</u>	31 000	(14)

La enzima EcoRI actúa a un pH óptimo entre 7.0-7.5, es inactivada arriba de 42 C, la temperatura óptima de reacción es 37 C, con requerimientos de 1-25 mM Mg +. aumento de la actividad por 50 mM de NaCl y se inhibe arriba de 100 mM.

La enzima PaiI. El pH óptimo es entre 7.4-7.8. La concentración óptima de Mg + es entre 10-15 mM con 50 % de la actividad observada en 2 y 28 mM. PCMB (p-clorimercuri benzoato) en concentraciones de 0.001mM inhibe completamente la enzima. NaCl y KCl en concentraciones de 20 y 50 mM no tienen efecto significativo en la actividad enzimática, pero éstas sales en 100 y 200 mM bajan la actividad de PaiI a 20 y 5 % respectivamente. La actividad enzimática baja rápidamente al diluirla. (Krishna, B. and Rushizky)

La enzima PstI tiene un pH óptimo de 7.4 y requerimientos de 10 mM de Mg +. La enzima parece cortar eficientemente el DNA a muy baja concentración de sal, al aumentar la concentración de sal la habilidad para digerir el DNA disminuye y arriba de 0.3 M de NaCl no se detecta digestión del DNA. En ausencia de Mg + PstI fué incapáz de cortar DNA. La endonucleasa PstI es inestable al calor, la actividad de la enzima se pierde completamente después de calentar durante 2 min a 37 C. Temperatura óptima 30 C (Smith et al)

CRITERIO DE PUREZA.

La purificación de las enzimas de restricción se puede llevar a cabo a diferentes grados, dependiendo del uso . Por ejemplo para propósitos de secuencia las enzimas deben de ser altamente purificadas y estar completamente libres de contaminantes como: fosfatasas, nucleasas específicas, endonucleasas no específicas, exonucleasas etc. Pero para estudios de mapeo físico de DNA no es necesario un alto grado de pureza ya que es suficiente con que se obtengan bandas bien definidas al ser digerido el DNA con la enzima y observado en geles de electroforesis. Algunas enzimas han sido purificadas a homogeneidad ya que se ha requerido monitorear el nivel de proteína sintetizada durante la fermentación, . Este tipo de purificación ha sido utilizado en la purificación de enzimas de restricción que provienen de microorganismos modificados genéticamente con lo cual las técnicas de ingeniería genética han abierto nuevas perspectivas para la formación de productos por medio de fermentación con microorganismos(Botterman, J.H. et al). También es utilizado este método de purificación para determinar las propiedades físicas de la enzima (Krishna, B. and Rushizky)

DEFINICION DE ACTIVIDAD.

Una unidad convencional para definir la actividad de la enzima de restricción es la cantidad de la enzima que digiere 1 μ g de DNA en una hora en un volumen de reacción de 20 μ l a 37 C. (Dubey, et al). Aunque la definición depende de los investigadores.

Por ejemplo en el caso de las enzimas que se producen en este

Centro, se ha definido la actividad de la enzima como la cantidad de enzima requerida para digerir μ g de DNA pBR322 en una hora a 37 C (o/ depende de la enzima)ya que para medir la actividad utilizamos los plasmidos pBRs.

Las enzimas de restricción producidas en el Centro tienen un alto grado de pureza.

O B J E T I V O

Las enzimas de restricción han llegado a ser herramientas esenciales para la manipulación y caracterización de moléculas de DNA. Su uso en el análisis de DNAs, tanto de Eucariontes como de Procariontes ha sido ya muy estudiado.

Algunas enzimas de restricción son comercialmente disponibles, pero son muy caras (además que son de importación) y a veces no de muy buena calidad.

Cuando un proyecto requiere grandes cantidades de enzima(s) el precio puede ser prohibitivo para llegar a desarrollarlo, teniendo la necesidad de restringir el planteamiento experimental.

El desarrollar la o las metodologías para la purificación de dichas enzimas, vale la pena ya que es posible obtener de 10 a 20 000 unidades cuando menos de enzima pura a partir de más o menos 50 g de células.

El objetivo de este trabajo fué iniciar la integración de una colección de diversas enzimas de restricción, que permita al Centro, reducir parte del presupuesto que se tiene destinado a la compra de estas enzimas y poder utilizarlo en otros rubros, además de poder aumentar el número de experimentos a realizar por el personal académico de la institución.

Por otro lado, la autosuficiencia en enzimas de restricción debería permitir tener un intercambio o venta de estas enzimas con otras Instituciones Nacionales, y se pueda pensar también en la exportación de las enzimas.

Las enzimas seleccionadas para llevar a cabo tanto el inicio de la colección de las enzimas como el estudio de la producción así como seleccionar el método de conservación de las mismas son, por la importancia que tienen al ser de las enzimas más utilizadas por el personal académico, son:

La enzima EcoRI producida por la bacteria Escherichia coliRY13

La enzima PalI producida por la bacteria Providencia alcalifaciens

La enzima PstI producida por la bacteria Providencia stuartii

MATERIALES

1. CEPAS .

La cepa de Escherichia coli que se utilizó es la siguiente :

HB101: F hsd S20, (r_h, m_h) rec AB, ara-14, pro A, lac Y1, galK, rps L20, (sm), xyl-5, mtl-1, sup E44,

Las cepas productoras de las enzimas de restricción en estudio son:

Escherichia coli RY13, productora de la enzima EcoR1

Providencia alcalifaciens ATCC 9866, productora de la enzima Pst1

Providencia stuartii 164, productora de la enzima Pst1

2. PLASMIDOS

Los DNAs de plásmido utilizados fueron el pBR322 y el pBR325

3. MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO LURIA líquido:

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
NaOH 2.5 N	1 ml
H2O bidestilada	1 l (aforar)

Se esteriliza todo junto

Para medio luria sólido se agregan 15g de bacto agar antes de aforar a 1 l y una vez estéril se vierten 20 ml de medio en cada

caja de petri, el medio debe estar caliente para que no se solidifique antes de tiempo.

MEDIO M-9

CaCl ₂ 0.01M	10 ml
MgSO ₄ 0.1M	10 ml
Glucosa 20 %	20 ml
Sales M-9 10X	100 ml
H ₂ O bidestilada	1 l (aforar)

Estos ingredientes se esterilizan cada uno por separado

SALES M-9

Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g
H ₂ O	1 l (aforar)

Estos ingredientes se esterilizan juntos.

MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA RY13 gal end (R1) :

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Glucosa	5 g
K-PO ₄	5 mM
Ampicilina	5 ug/ml
H ₂ O	1 l (aforar)

MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA Providencia stuartii:

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1 l (aforar)

MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA Providencia alcalifaciens ATCC 9866 :

Bacto peptona	8 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O	1 l (aforar)

4. ANTIBIOTICOS

AMPICILINA : 25 mg/ml en agua, esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20 grados C.

Para cajas : 35-50 ug/ml guardar a 4 C (únicamente 1 ó 2 semanas)

CLORANFENICOL : 35 mg/ml en etanol, alícuotar y guardar a - 20 C

Para cajas : 10 ug/ml

TETRACICLINA : 12.5 mg/ml en etanol agua (50 % v/v) esterilizar por filtración y guardar a -20 C en oscuridad.

Para cajas : 12.5 - 15 ug/ml guardar las cajas en oscuridad y a 4 C

AMPLIFICACION DE PLASMIDOS :

CLORANFENICOL : 170 ug/ml

ESPECTINOMICINA : 300 ug/ml

5. ENZIMAS

ENZIMAS

PREPARACION

RNAasa (Sigma)

10 mg/ml en: NaOAc 0.1 M, EDTA 3.3 X
10 M pH 5.0, calentar a 85 C durante
10 min, utilizar a 37 C.

Lisozima (Sigma)

5 mg/ml en : Tris-HCl 25 mM pH 8.0,
incubar a 20 C.

M E T O D O L O G I A

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO.

El DNA de plásmido se prepara mediante la amplificación de cultivos en fase de crecimiento exponencial a través de la adición de 170 mg/l de cloranfenicol cuando el plásmido no codifica para dicha resistencia y de 300 mg/l de espectinomicina en el caso contrario.

La extracción y purificación del DNA de plásmido se lleva a cabo por el método de Maniatis et al. (1982) con algunas modificaciones y que consta de los siguientes pasos.

1) Las células portadoras del plásmido por purificar se incuban en 10 ml de medio Luria a 37 C y con agitación (200 rpm) toda la noche.

2) Se agregan 0.1 ml de este cultivo a 25 ml de Luria. Se incuba a 37 C con agitación hasta que el cultivo alcance la fase logarítmica tardía (DO 595 = 0.6).

3) Se inoculan los 25 ml a 500 ml de medio M9 preincubado a 37 C y se incuba 2.5 hrs con agitación. La DO 595 debe ser aproximadamente de 0.4.

4) Se añaden 170 ug /ml de cloranfenicol o 300 ug/ml de espectinomicina para amplificar el plásmido.

5) Se incuba a 37 C por 12 a 14 hrs con agitación.

6) Se centrifugan las células a 5520 g por 10 min

7) Se lavan las células con 100 ml de STE frío (NaCl 0.1M, TRIS-HCL 10 mM pH 7.8 y EDTA 1mM)

8) Se suspenden las células en 10 ml de la solución 1 y se añaden 5 mg/ml de Lisozima.

Solución 1

glucosa	50 mM
TRIS-HCL	25 mM pH 8.0
EDTA	10 mM

9) Se transfiere a un tubo de ultracentrifugación y se incuba 5 min a temperatura ambiente.

10) Se añaden 20 ml de la solución 1l recién preparada y a 0 C. Se tapa el tubo y se mezcla su contenido por inversión repetida. Se incuba 10 min en hielo.

Solución 11

NaOH	0.2 N
SDS	1.0 %

11) Se añaden 15 ml de una solución 5M de acetato de potasio fría preparada de la siguiente manera : a 60 ml de acetato de potasio 5 M, se añaden 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. Se tapa el tubo y se mezcla por inversión violenta. Se incuba 10 min en hielo.

12) Se centrifuga a 48,400 g, 20 min a 4 C.

13) Se transfieren cantidades iguales de sobrenadante a 2 tubos corex de 30 ml.

14) se añaden 0.6 volúmenes de isopropanol a cada tubo. Se mezcla bien y se incuba 15 min a temperatura ambiente.

15) Se centrifuga a 17,400 g por 30 min a temperatura ambiente.

16) Se descarta el sobrenadante. Se lava el botón (sedimento) con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se elimina el etanol y se seca el botón con vacío.

17) Se disuelve el DNA en TE pH 8.0 (TRIS-HCL 10 mM pH8.0, EDTA 1 mM pH8.0) a una concentración de por lo menos 100ug/ml

18) Se añade RNasa libre de DNasa a una concentración final 19 ug/ml. Se incuba 1 hr a temperatura ambiente.

19) Se prepara un tubo de ultracentrifuga que contenga 4 ml de cloruro de sodio 1.0 M disuelto en TE. Se pone la solución de DNA sobre la solución de cloruro de Sodio. Se llena el tubo con buffer TE. Se centrifuga 6 hs a 40 K a 20 C en ultracentrifuga (rotor SW 50.1). El DNA se sedimenta en el fondo del tubo mientras que el RNA permanece en el sobrenadante.

20) Se descarta el sobrenadante. Se disuelve el botón de DNA en el volumen deseado de TE.

21) Se mide el volumen de la solución de DNA. Por cada ml añadir 1 g de CsCl sólido. Se mezcla en tubos especiales para ultracentrifuga hasta que la sal se disuelva.

22) Se añaden 0.8 ml de solución de yoduro de propidio (10 mg/ml) por cada 10 ml de solución de CsCl. Se mezcla por inversión repetida.

23) Se ultracentrifuga a 38K 20 hrs a 20 C en un rotor Beckman SW 50.1.

24) Deben verse 2 bandas de DNA en luz ordinaria. La superior consiste en DNA cromosomal lineal y DNA de plásmido circular abierto; la banda inferior consiste en DNA de plásmido circular cerrado y superenrollado.

25) Se colecta la banda inferior haciendo un orificio en el fondo del tubo y controlando el goteo.

26) El líquido colectado se diluye 1:1 con buffer Dowex (NaCl 1M, TRIS-HCL 50 mM, EDTA 1mM) y se pasa por una columna de resina Dowex AG-X8 para eliminar el yoduro de propidio.

27) Posteriormente el líquido se dializa haciendo 3 cambios de 1000 volúmenes de buffer TE y se precipita con 1/25 de volumen de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, congelando en hielo seco.

28) Se centrifuga a 12 100 g una hora. Se elimina el etanol y se seca al vacío.

29) Se resuspende en 0.5 a 1 ml de agua bidestilada estéril y se mide la DO para determinar la concentración de DNA.

TRANSFORMACION DE UNA CEPA DE E.coli

Este método se llevó a cabo según el método descrito por Cohen et al. (1972) con algunas modificaciones:

1) Se centrifugan 30 ml de cultivo de la cepa que se desea transformar a una DO 595 = 0.4 en crecimiento exponencial en medio Luria a 5110 g 10 min y se lava el botón con 15 ml de NaCl 10 mM frío

2) Se resuspende el sedimento en 15 ml de CaCl₂ 30 mM frío y se mantiene en hielo durante 20 min.

3) Se centrifugan las células 10 min a 5110 g y se resuspenden en 2 ml de la misma solución de CaCl₂

4) inmediatamente se agregan 0.2 ml de esta suspensión a un tubo que contenga 0.1 ug de DNA del plásmido que se desea transformar en 0.1 ml de CaCl₂ frío

5) Se mezcla suavemente y se mantiene el tubo 60 min a 0 C

6) Se dá a las células un choque térmico a 42 C durante 70 seg e inmediatamente se pasan a 0 C durante 5 min.

7) Se agregan 3 ml de Luria y se incuba a 37 C con agitación durante 2 hs

8) Se inoculan de 0.1 a 0.2 ml del cultivo transformado en cajas de petri con medio Luria sólido con el antibiótico necesario para la selección de las colonias transformantes

9) Se incuban las cajas a 37 C durante 16 hrs al menos

MICROENSAYO DE DNA DE PLASMIDO

Se utilizó el metodo de lisis alcalina descrito por Maniatis et al. (1982)

1. Se inoculan 3 ml de medio luria que contiene el antibiótico adecuado con una colonia bacteriana aislada. Se incuba a 37 C toda la noche con agitación (200 rpm)

2. Se centrifugan 1.5 ml del cultivo 2.5 min a 12 K en una microfuga

3. Se decanta el medio dejando el botón de bacterias lo más seco posible

4. Se resuspende el botón en 100 ul de la solución I fria. En este caso se le añaden 4 ug de lisozima en polvo antes de usarla

5. Se incuba 5 min a temperatura ambiente. El tubo debe estar abierto durante este periodo

6. Se añaden 200 ul de solución II fria y recién preparada. Se tapa el tubo y se mezcla el contenido por inversión rápida dos o tres veces suavemente. Se incuba 5 min en hielo

7. Se añaden 150 ul de la solución III. Se tapa el tubo y se agita ligeramente en posición invertida durante 10 segundos. Se incuba en hielo

8. Se centrifuga a 12 K durante 5 min a 4 C

9. Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo

10. Se le añade un volumen igual de fenol y otro de cloroformo. Se mezcla bien en vortex. Se centrifuga 2 min a 12 K y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo con cuidado de no arrastrar fenol

11. Se añaden 2.5 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcla bien. Se incuba 2 min a temperatura ambiente

12. Se centrifuga 5 min a 12K a temperatura ambiente

13. Se decanta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 70%

a temperatura ambiente. Se mezcla bien y se incuba 2 min a la misma temperatura

14 Se descarta el sobrenadante y se seca el botón en un desecador al vacío

15. Se resuspende el botón de DNA de plásmido seco en 20 ul de agua bidestilada y filtrada

16. Se lleva a cabo la digestión con la enzima de restricción adecuada y se corre en un gel de agarosa o acrilamida según sea el caso

Electroforesis de DNA en Geles de Agarosa y Acrilamida

La electroforesis se llevó a cabo conforme a las condiciones descritas por Bolívar et al (1977):

1. Se disuelve por ebullición agarosa en polvo al 1% durante 1 min en una solución TRIS-Boratos-EDTA (Tris base 90 mM, EDTA 2.5 mM y H3BO3 90 mM pH 8.2)

2. Se sellan las uniones de placas y separadores con agarosa. Se vacía la agarosa o acrilamida según el tipo de gel y se deja solidificar

3. Las muestras en un volumen final de 15 a 39 ul por carril (0.3 a 1 ug de DNA por carril) se disuelven en 6 ul de mezcla de parado "SM" (para 10 ml: 6g de urea, 1ml de azul de bromo fenol al 0.5% en agua y 1 ml de xilencianol al 0.5% en agua) y se colocan con cuidado en los carriles del gel ya montado en una cámara de electroforesis con Buffer TRIS-Boratos-EDTA

4. Las electroforosis se realizan a 150 V para geles de agarosa y a 200 V para geles de acrilamida durante aproximadamente 60 min

5. Un a vez transcurrido ese tiempo, el gel se saca y se sumerge en una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) durante 1 a 5 min y se coloca sobre un transiluminador de luz ultravioleta. El DNA se observa como bandas fluorescentes

Los geles de acrilamida para DNA se usan para fragmentos menores de 1000 pb y se preparan de la siguiente manera:

1. Se mezclan 3 ml de buffer TRIS-Boratos-EDTA 10X 19.4 ml de agua, 7.5 ml de una solución de acrilamida-bisacrilamida (29.2% y 0.8 % respectivamente), 140 ul de persulfato de amonio al 10 % y 14 ul de TEMED

2. Se mezcla bien la solución y se vacía rápidamente en las placas de vidrio

3. Se deja polimerizar de 15-20 min a temperatura ambiente, o bien de 5 a 10 min a 65 C

Para tomar fotografías de los geles, se utiliza un filtro de gelatina amarillo #9 Kodak - Wratten y película Kodak Royal Pancromática (10.2 X 12.7 cms)

LISIS DE CELULAS BACTERIANAS POR SONICACION

La lisis de las células se llevó a cabo en un aparato soniprep modelo 150 estandarizándola para 50 g de células de la siguiente manera:

1. La pastilla celular congelada se descongela y resuspende en 200 ml de 10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ pH 7.0, 7 mM Mercaptoetanol, 1 mM EDTA (buffer de extracción) conteniendo 25 ug/ml de PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo), 1 mM de NaN₃ y 0.4 M de NaCl

2. La sonicación se llevó a cabo en pulsos de 30-90 segundos con la suspensión celular agitada y en hielo, cuidando de que la temperatura no suba a más de 10 C.

Algunas de las cepas fueron resistentes a la sonicación. Las cuales fueron descongeladas y se les agregó 100 ug/ml de lisozima de 15 -20 min antes de sonicar.

La suspensión sonicada fué centrifugada durante 1 hora a 26 000 rpm en una ultracentrifuga Beckman en el rotor 'SW28.

ANALISIS DE LA ENZIMA

La enzima se analiza por electroforesis del DNA digerido en geles de poliacrilamida o agarosa y con buffer TRIS-Boratos.

MEZCLA DE REACCION

1 ul pBR322
2 ul buffer 10 X (según la enzima)
1 ul Enzima
16 ul agua

20 ul incubar a 37 C 1 hr

R E S U L T A D O S

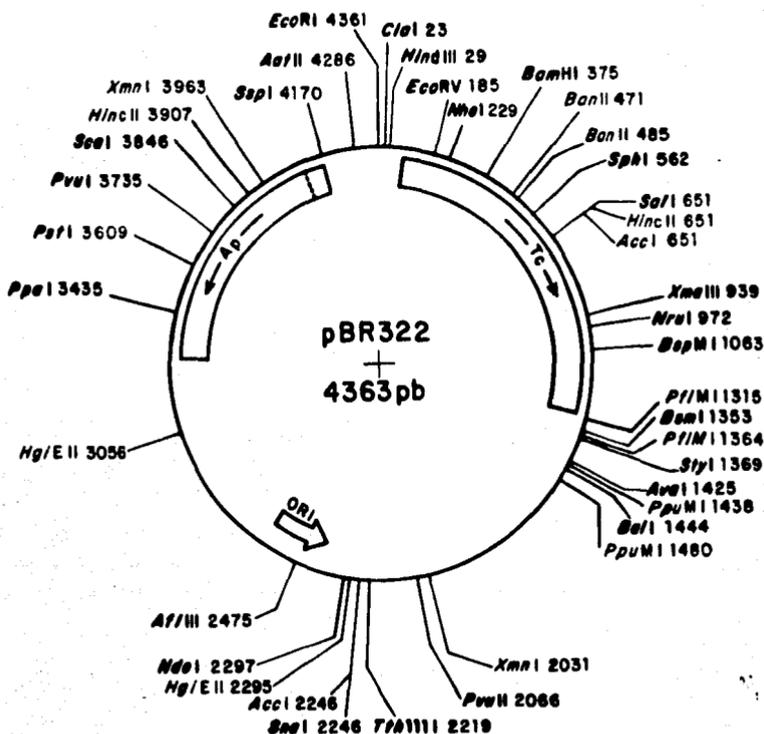
PURIFICACION DE DNAs DE PLASMIDO

La extracción y purificación de 2 DNAs de plásmido (pBR322 y pBR325, Bolivar , F. 1977) se llevó a cabo utilizando el método de lisado claro, descrito por Betlach y fueron preparados mediante la amplificación de cultivos en crecimiento en fase exponencial a través de la adición de 170 mg/l de cloranfenicol para el caso de pBR322 y de 300 mg/l de espectinomicina en el caso del pBR325; obteniéndose 1.5 mg de pBR322/l de medio de cultivo y 2.0 mg de pBR325/l de medio de cultivo, cantidades suficientes para iniciar el proceso de purificación de las enzimas aunque colateralmente a la purificación de las enzimas se tiene que continuar con la purificación de DNAs , debido a la gran cantidad de DNA necesario que se utiliza tanto para seguir el proceso de purificación como para la caracterización de la enzima.

Así mismo se estandarizó también la purificación del DNA de plásmido por el método descrito por Maniatis.

La transformación de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el método descrito por Cohen et al (1972) y para identificar las cepas que llevan el plásmido se utiliza un microensayo de DNA descrito por Maniatis.

Plásmido pBR322



Replicón tipo: ColE1 relajado, que proviene del plásmido pMB1.

Marcadores de Selección: Gene de resistencia a Ampicilina (Ap) que se originó del transposon Tn3 el cual se transcribe en contra de las manecillas del reloj; y el gene de resistencia a Tetraciclina (Tc) que proviene del pSC101 y se transcribe en el sentido de las manecillas del reloj.

Sitios de Restricción Unicos que Inactivan Marcadores:

en Ap: PpaI, PstI, PvuI, ScaI

en Tc: HindIII, EcoRV, NheI, BamHI, SphI, SalI, EagI, NruI, BspMI.

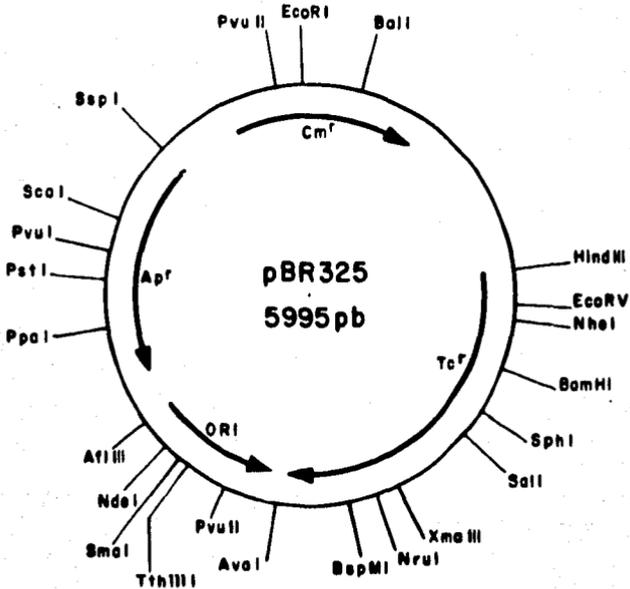
Referencia: Bolívar et al (1977) Gene 2,95-113.

Sutcliffe, J.G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741.

Comentario: Este vehículo ha dado origen a la mayoría de los vectores moleculares utilizados actualmente.

Nota: La localización de los sitios de restricción en el plásmido de aquellas enzimas que cortan a la molécula una sola vez (letras oscuras) o dos veces, se muestran en la figura.

Plásmido pBR325



Replicón tipo: ColE1 relajado.

Marcadores de Selección: Ampicilina (Ap), Tetraciclina (Tc) y Cloranfenicol (Cm).

Sitios de Restricción Únicos que Inactivan Marcadores:

en Ap^r: PpaI, PstI, PvuI, ScaI

en Cm^r: PvuII, EcoRI, BclI

en Tc^r: HindIII, EcoRV, NheI, BamHI, SphI, SalI, EagI, NruI, BspMI

Referencia: Bolívar, F. (1978), *Gene* 4, 121-136.

Comentario: Es un plásmido derivado del pBR322, al cual se le insertó el gen de resistencia a cloranfenicol, obtenido del fago PICm^r.

SISTEMA DE PRODUCCION DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

CULTIVO DE CELULAS Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO.

Para la producción de la enzima deseada, el microorganismo seleccionado es cultivado en un medio propicio en condiciones ambientales adecuadas de pH, temperatura, tensión de oxígeno, etc. en un periodo de tiempo adecuado. Las condiciones de cultivo ejercen un efecto significante en la fisiología y el metabolismo de microbios y su capacidad de síntesis.

Para maximizar la producción de una proteína en particular, la manipulación de las condiciones de cultivo es esencial .

La información de los procesos biotecnológicos en aspectos de producción de enzimas de restricción es escaso. El enriquecimiento del cultivo y las condiciones varían y dependen de la naturaleza del organismo el cual produce la enzima de restricción

El rendimiento final de la enzima depende en gran parte del número de pasos empleados para la purificación de la enzima.

Es importante notar que el periodo de crecimiento del cultivo es un factor importante para obtener una producción y productividad óptimas de la enzima.

SISTEMA DE SEPARACION DEL PRODUCTO

ESQUEMA DE LOS PASOS INVOLUCRADOS EN LA EXTRACCION DE LA ENZIMA DE RESTRICCION INTRACELULAR.

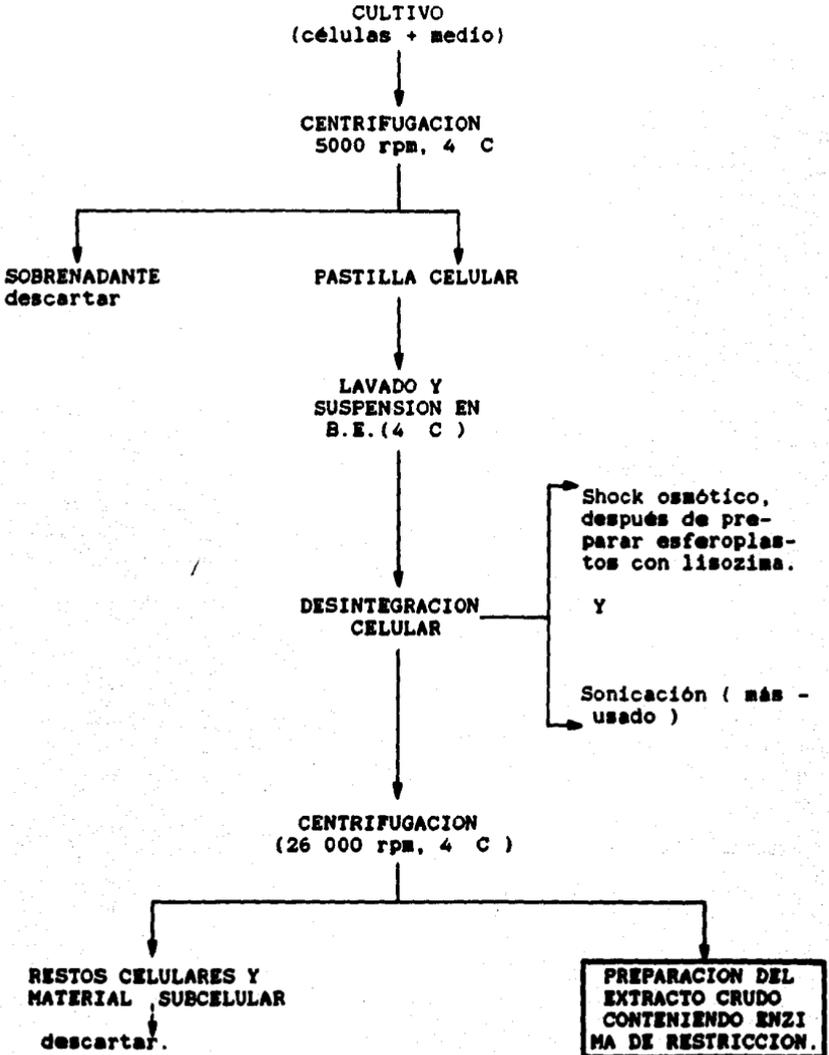


Tabla 1. Medio de cultivo, condiciones de cultivo y producción de enzima.

ORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES DE CULTIVO	ENZIMA
<u>Escherichia coli</u> Rv13	L-Broth c/: Bactotripton 10 g. Extracto de lev.5 g. NaCl 10 g. Glucosa 5 g. Fosfato de potasio: 5 mM	Temp. 37 C pH: 7.0 Aereación: 200 rpm inc. Periodo de - cosecha:fase- estac. temp.	<u>EcoRI</u>
<u>Providencia</u> <u>alcalifaciens</u>	Bactopeptona 8%. Extracto de lev 5%	Temp. 37 C pH: 8.0 Aereación: 200 rpm. Periodo de- cosecha: 20 hs	<u>PstI</u> isisquisó- mero de <u>HpaIII</u>
<u>Providencia</u> <u>stuartii</u>	Tryptona 15 g. Extracto de lev.10 g NaCl 5 g.	Temp. 37 C pH. 8.0 Aereación: 200 rpm. Periodo de- Cosecha: después de 16 Hs.	<u>PstI</u>

Tabla 2. Condiciones de crecimiento y producción de enzimas.

ENZIMA	CEPA	EQUIPO/ CANT. MEDIO	TIEMPO/ RENDIMIENTO.
<u>EcoRI</u>	<u>Escherichia coli</u> RY13	Matraz fernbach, 18 l de medio	30 hs/40g cels.
<u>PaiI</u>	<u>Providencia</u> <u>alcalifaciens</u>	Ferm. alta dens. 20 l de medio	20 hs/200 g cels.
<u>PstI</u>	<u>Providencia</u> <u>stuartii</u>	Matraz fernbach, 20 l de medio.	24 hs/50 g cels.

SISTEMA DE PURIFICACION DEL PRODUCTO

de los innumerables métodos de purificación que existen (a nivel laboratorio) ya que prácticamente cada endonucleasa reportada ha sido purificada por un método particular) se ha seleccionado el método descrito en " A general method for the purification of restriccion enzymes " Greene et al , el cual es un proceso sintetizado que ha sido desarrollado para la purificación de enzimas de restriccion . este procedimiento usa cromatografía en fosfocelulosa e hidroxylapatita y las enzimas así purificadas están lo suficientemente puras para permitir su uso en secuenciación , clonación molecular y mapeo físico del DNA.

Este método ha sido modificado ligeramente al purificar las enzimas en estudio , aunque la idea es estandarizar un método que permita ser utilizado para la purificación de varias enzimas de restriccion en forma rutinaria. En base a este método se describen a continuación los esquemas de purificación llevados a cabo para las 3 enzimas que se estan estudiando.

RESULTADO DE LA PURIFICACION DE LA ENDONUCLEASA PstI.

La bacteria Providencia stuartii (productora de la endonucleasa PstI) donada por el Dr. Jean Lemans y la Dra. Alejandra Covarrubias del centro de fijación de nitrógeno, fué crecida en el siguiente medio de cultivo:

10 g de bacto triptona
5 g de extracto de levadura
10 g de NaCl
1 litro de agua.

en matraces fernbach a 37 grados C con 200 rpm de agitación, durante 16 Hs. aproximadamente, al cabo del tiempo se centrifugó a 6500 rpm en un rotor GS3 en una centrifuga Sorvall durante 20 minutos, el paquete celular se lavó en un buffer 0.01M Tris-HCl pH8.0; 0.03M de NaCl, centrifugando posteriormente en la misma centrifuga durante 10 minutos, el paquete celular se guardó a -70 grados C durante 6 dias, al cabo del cual se procesó para extraer la endonucleasa de la manera siguiente:

De 55 g de celulas congeladas de Providencia stuartii, se hizo un extracto, disolviendo previamente en un buffer de extracción de fosfatos y con 100 ug/ml de lisozima, sonicando 8 minutos (en pulsos de 1 minuto) y centrifugando a 26 000 rpm en rotor SW28 durante 45 minutos y a 4 grados C en una ultracentrifuga Beckman.

El extracto celular se pasó por dos columnas de fosfocelulosa; la primera de 19.5 cm de cama/3.5 cm de diámetro, encontrándose actividad de la fracción 70 a la 95 (se hizo un pool de estas fracciones dando aproximadamente 140 ml, el cual al medir la conductividad se llevó a 700 ml con un buffer de extracción sin NaCl, para posteriormente pasarlo por una columna de fosfocelulosa más pequeña (10 cm de cama /2.5 cm de diámetro) la cual se lavó con buffer de extracción sin NaCl y gradualmente se subió la concentración de NaCl hasta eluir la endonucleasa con 0.6M de NaCl en buffer de extracción, encontrándose la actividad en las fracciones de la 9 a la 22, dándonos actividades muy diferentes por lo que se tubieron que hacer diferentes pools una vez que habian sido dializados y concentrados en un buffer de almacenamiento (el cual está constituido por: 10mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, 4 mM B-Mercapto ethanol, 0.5mM EDTA, 0.5mM Na₃N, 0.1M NaCl y Glicerol 50% a pH 7.0.)

LAS FRACCIONES (F) OBTENIDAS FUERON :

F 1	aproximadamente	3.5 ml	con una actividad de	30 U/ul
F 2	" "	3.5 ml	" " "	4 U/ul
F 3	" "	20 ml	" " "	5 U/ul
F 4	" "	20 ml	" " "	1 U/ul

CALIDAD DE LA ENZIMA:

Se midió la pureza de la enzima, haciéndola reaccionar en exceso con DNA de plásmido a 30 grados C y dejándola durante 24 horas, no encontrando actividad de exonucleasas puesto que el DNA así tratado fué visto en geles de agarosa al 1% intacto; a los 4 días de estar en contacto la enzima con el DNA se observa una ligera degradación.

SE REPITIO ESTA PURIFICACION EN CONDICIONES SIMILARES A LAS DESCRITAS ANTERIORMENTE, OBTENIENDOSE APROXIMADAMENTE 30 ML CON UNA ACTIVIDAD DE 5 Unidades/ul

Se cuenta con 50 g más de pasta celular de la cepa productora de la enzima Pst1.

ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA ENZIMA PstI

ENZIMA ORGANISMO

SECUENCIA DE PASOS
DE LA PURIFICACION

PstI Providencia
 stuartii

Recuperación c/paso : 70%

Rendimiento: 33%

Extracto crudo

Fosfocelulosa P11
elución
gradiente
0.2 a 0.6M
de NaCl

Fosfocelulosa P11
elución
gradiente de
0.2 - 0.6 M
de NaCl.

Concentrar-Dial

Enzima pura.

RESULTDO DE LA PURIFICACION DE LA ENDONUCLEASA Pall

La bacteria Providencia alcalifaciens obtenida de la colección ATCC fué crecida en el fermentador de alta densidad en un medio que contiene por litro de agua lo siguiente:

10 g de bacto triptona
5 g de extracto de levadura
10 g de NaCl

a 37 grados C durante 12 Hs.

Se sonicaron 45 g de células de Providencia alcalifaciens, disueltas previamente en 200 ml de buffer de extracción con 0.4M de NaCl + 100ug/ml de losozima, durante 10 minutos en pulsos de 11/2 minutos.

Se centrifugaron durante 60 minutos a 26 000 rpm en el rotor SW28 a 4 grados C en la ultracentrifuga Beckman.

Se decantó y se ajustó la conductividad a 0.1M de NaCl en buffer de extracción así como el pH.

El extracto se pasó por 3 columnas de fosfocelulosa; primero por una de 20 cm de cama por 3.5 cm de diámetro de la cual la actividad se observó desde al fracción 80 a la 105, se juntaron estas fracciones y se pasaron por otra columna de fosfocelulosa (de 10 cm de cama por 2.0 cm de diámetro) , en este caso no se pegó la enzima, probablemente por no haber tenido la misma conductividad la muestra que la columna, ya que la mayor actividad se encontró en el eluado.

El eluado con actividad se pasó por otra columna de fosfocelulosa (9.0 cm de cama por 1.5 cm de diámetro) obteniéndose aproximadamente 200 ml de enzima pura con una actividad de 20 Unidades /ul una vez concentrada en buffer de almacenamiento (10Mm K2HPO4-KH2PO4, 4mM B Mercapto etanol, 0.5mM EDTA, 0.5mM NaN3, 0.1mM NaCl y glicerol 50%)

La endonucleasa Pall se almacenó en: Nitrógeno líquido, a -20 grados C, a 4 grados C y a temperatura ambiente.

CALIDAD DE LA ENZIMA.

Se midió pureza de la enzima dejando el DNA de plásmido pBR322 con un exceso de la endonucleasa por 24 Hs y más (aproximadamente 5 días) y posteriormente ligando una alícuota .

SE CUENTA CON 50 g MAS DE PASTA CELULAR PRODUCTORA DE LA ENZIMA Pall PARA INICIAR OTRO PROCESO DE PURIFICACION.

ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA ENZIMA P₁₁

ENZIMA	ORGANISMO	SECUENCIA DE LOS PASOS DE LA PURIFICACION
--------	-----------	---

<u>P₁₁</u>	<u>Providencia</u> <u>alcalifaciens</u>
-----------------------	--

Extracto crudo

(2X) FosfoCelulosa P11

elución c/
gradiente sal
0.2 - 0.6 M

Recuperacion c/paso: 70%

Rendimiento : 33 %

Concentrar

Diálisis
Sacarosa
Liofilizado.

Enzima pura.

Caracterizar.

RESULTADO DE LA PURIFICACION DE LA ENDONUCLEASA EcoRI

La cepa RY13 gal end (R1) productora de la endonucleasa EcoRI fué proporcionada por la Dra. Aurora Bruner del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y se creció en el siguiente medio de cultivo:

para 1 lt. de medio de cultivo

10 g de bacto triptona
5 g de extracto de levadura
10 g de NaCl
5 g de glucosa
5 mM KPO₄ pH 7.0.
50 ug/ml de ampicilina.

Crecida en matraces fernbach a 37 grados C de 24 a 37 Hs. con 200 rpm. de agitación.

25 g de células se sonicaron en 50 ml de buffer de extracción con 0.4M de NaCl durante 4 min. en pulsos de 1 minuto., se centrifugó a 25000 rpm durante 90 minutos, decantando el sobrenadante al cual se le ajustó la conductividad y el pH y se pasó por una primera columna de fosfocelulosa de 19 cm. de cama por 2.5 cm de diámetro, se hizo un pool de los tubos 73 a 82 que fueron en los que se encontró la actividad, pasándose este pool por una segunda columna de fosfocelulosa (de 10 cm de cama por 2.0 cm de diámetro), encontrándose actividad de los tubos 15 al 27. , se hizo un pool, se dializó contra buffer de extracción y se concentró con buffer de almacenamiento con 50% de glicerol.

Como resultado de esta purificación se obtuvo aproximadamente 20 ml de enzima EcoRI con una actividad de 12 u/ul

CALIDAD DE LA ENZIMA:

La pureza de la enzima se probó haciendo una digestión del plásmido pBR322 con un exceso de la enzima , ligándose posteriormente y digiriendo nuevamente con la misma enzima.

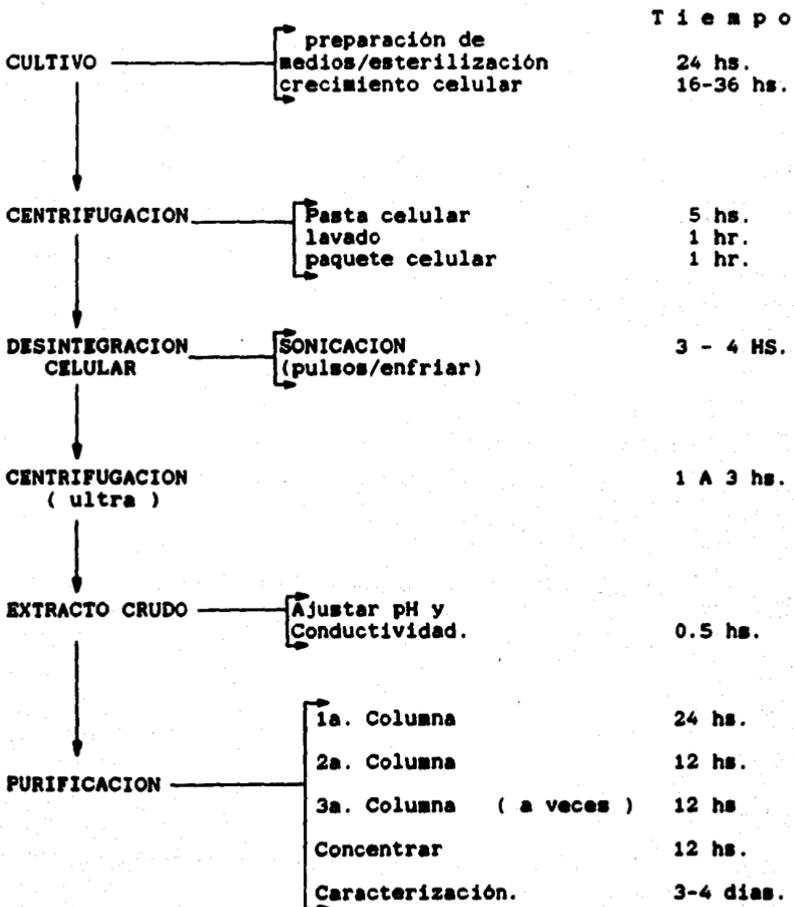
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TIEMPO NECESARIO PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS DE RESTRICCION

Trabajo no Continuo :

Trabajo por semana : 48 sem/ 5 dias/40 hs.

Estimación del tiempo necesario para la producción de enzimas de restricción:



ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA ENZIMA EcoRI.

ENZIMA

ORGANISMO

SECUENCIA DE PASOS DE LA
PURIFICACION

EcoRI Escherichia coliRY13

Extracto Crudo.

Fosfocelulosa P11

-elución
gradiente sal
en B de E. +

Hidroxilapatita

-elución
gradiente PO4
0.1 a 0.5 M

Recuperación C/paso: 65-70%

Rendimiento: 30 %

Concentrar

-Sacarosa
Dial. B.A
liofilizado

Enzima Pura.

Caracterizar

+Buffer de extracción (10 mM k2-k PO4)

*Buffer de Almacenamiento.

se llevó a cabo otra purificación de la enzima EcoRI, con una pasta celular crecida durante 25 hs a 37 grados C con 200 rpm de agitación . se utilizaron las mismas condiciones tanto para el crecimiento como para el proceso de purificación que las reportadas anteriormente y como RESULTADO OBTUVIMOS 20 ML DE LA ENZIMA EcoRI CON UNA ACTIVIDAD DE 5 Unidades/ul.

El grado de pureza de la enzima se midió haciendo una digestión del plásmido pBR322 con un exceso de la enzima, ligándolo posteriormente y digiriéndolo nuevamente con la misma enzima.

Se cuenta con 50 g más de pasta celular productora de la enzima EcoRI crecida durante 25 hs.

RESULTADO DE LOS SISTEMAS DE CONSERVACION DE LAS ENZIMAS.

Con respecto a la conservación de las enzimas se tiene la experiencia de que guardadas a -20 grados C con 50% de glicerol se han conservado por mucho tiempo, sin embargo también estamos utilizando el mantenerlas en nitrógeno líquido, a 70 C y a 4 C

Se liofilizó parte de la enzima Pall ya que se obtuvo un exceso y de esta manera se concentró adicionándole 50% de glicerol. La enzima así liofilizada nos permitirá probar otro sistema de conservación para las mismas.

De las diferentes formas en que almacenamos la enzima Pall, solamente detectamos disminución de la actividad al guardarla almacenada a 4 grados C condición en la que después de 1 semana ya no encontramos actividad, e la enzima. Las otras formas de conservación son muy estables ya que al cabo de más o menos 1 año cuando mucho han perdido un 10 % de su actividad inicial.

Por lo tanto podemos concluir que la conservación de las enzimas guardadas a - 20 C, a -70 C y en nitrógeno líquido se mantienen muy estables y casi sin disminución de la actividad de las enzimas.

CONCLUSIONES

Es importante resaltar que el periodo de crecimiento de los cultivos para producir las enzimas es un factor importante para obtener un rendimiento y productividad optimos de la enzima de restricción deseada.

Asimismo el estudio y potimización adecuado del tiempo de cultivo y de las condiciones de cosecha de las células en gran escala ,son esenciales para la obtención de una alta producción y una recuperación máxima para las enzimas de restricción. Los rendimientos obtenidos (g de células) de los microorganismos productores de las enzimas de este estudio se presentan en la tabla 2. El rendimiento final de la enzima depende en gran medida del número de pasos empleados para la purificación de la enzima.

El método general utilizado en la purificación de estas enzimas es el descrito en " A GENERAL METHOD FOR THE PURIFICATION OF RESTRICTION ENZYMES " de Greene et al el cual es un proceso que ha sido desarrollado para la purificación de varias enzimas de restricción y a su vez al estandarizar el método se redujo el número de pasos involucrados en la purificación ,eliminando algunos como es la precipitación de ácido nucléicos. Brevemente, en este método el uso de altas concentraciones de NaCl, permite la disociación de las enzimas unidas la DNA; de esta forma, al pasar el extracto por la fosfocelulosa, solo se adhieren enzimas con afinidad a la resina, mientras que los ácidos nucléicos se eluyen durante el paso de la muestra y en el lavado. Las proteínas que se quedan adheridas a la fosfocelulosa son eluidas por fuerza iónica con un gradiente lineal de NaCl.

El siguiente paso es utilizar otra columna de fosfocelulosa de menor tamaño con la que se concentra la enzima y que permite una mayor pureza.

Tanto experimentalmente como en reportes en la literatura los rendimientos alcanzados por varias enzimas van de 0.1 % al 50 %, aunque al utilizar microorganismos modificados genéticamente por técnicas de Ingeniería Genética se ha logrado producir 30% más de la proteína celular (Eco R1) a diferencia de una cepa nativa productora de la enzima EcoR1, la cual produce 0.01% de la proteína celular total.

Las recuperaciones y rendimientos aproximados de la purificación de c/u de las enzimas en estudio se presentan en los esquemas de purificación para c/ enzima, los calculos son aproximados y en comparación con lo reportado en la literatura , son inferiores.

Los bajos rendimientos obtenidos se deben probablemente a un conjunto de diferentes problemas, entre los cuales los más importantes son:

- Parte de la enzima se encuentra atrapada en la pastilla celular obtenida al romper las células y centrifugar (en este paso, la pérdida por atrapamiento puede ser del 50% ó más)

- A través de la actividad de la enzima no se puede monitorear el nivel de proteína sintetizada durante la fermentación (aunque es el método más utilizado por la rapidez de conocer los resultados y además lo más importante de este tipo de purificación es conocer y obtener la enzima activa), la cuantificación de la cantidad de proteína debe llevarse a cabo en geles de poliacrilamida-SDS o en mediciones por Lowry lo cual parece ser el método más confiable para seguir la síntesis del producto durante la fermentación.

- En la columna de fosfocelulosa aproximadamente el 1% de la actividad de la enzima no se pega a la columna y se pierde; en la columna de hidroxilapatita la pérdida es mínima y la enzima pura se encuentra en las fracciones del pico de actividad. Con este procedimiento es posible recuperar el 50% de la actividad de la enzima (EcoR1) en casi una veinteava parte del volumen original.

Aunque (en nuestro caso) se pierde un poco más de enzima en el gradiente de elución sobre todo en la primera columna de fosfocelulosa en la cual se tienen muchos contaminantes alrededor de la elución de la enzima lo cual hace que se reduzca el "pico de fracciones con enzima " descartando algunas que presentan contaminación .

De esta forma se han purificado las 3 enzimas que integran por el momento la colección de enzimas en el Centro. además las enzimas así purificadas tienen un alto grado de pureza, en lo que se refiere a enzimas contaminantes que tienen como sustrato DNA.

En cuanto a la conservación de las enzimas se estableció almacenarlas a - 20 C y en nitrógeno líquido.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Bolivar, F. en Tecnología Enzimática, A.López-Munguía y R. Quintero (ed), UNAM, México, 1987. 34-35.
2. Lao, W.D and Chen, S.Y. 1986. Scientia Sinica 29. 947
3. Dubey, A.K. Mukhtopadhyay, S.N. Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. Process Biochemistry. 1987. 25-34.
4. Krishna, B. and G.W. Rushizky. Analytical Biochemistry. 1979. 99, 207-212.
5. Smith, D., F.R. Blattner and J. Davis. Nucleic Acids Res . 1976. 3 No.2 343-353.
6. Botterman, J.H., D.R. De Buyser., J.A. Spriet, M. Zabeau. Biotechnology and bioengineering. 1985. CCVII, 1320-1327.
7. Apuntes de la clase de Ingeniería Bioquímica, Proyecto de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología., Impartida por el Dr. Rodolfo Quintero, 1989 (Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM.)
8. Protocolos Experimentales reales de la purificación de las enzimas de restricción (*EcoRI*, *PstI*, *PvuII*). Unidad de Reactivos Biológicos y Purificación de Proteínas. Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM.
9. Arber, W. and Dussoix, D., J.Mol.Biol. 1962, 5:18
10. Greene et al. Nucleic Acids Res. 1978. 5: 7: 2373-2380
11. Genetic Engineering and Biotechnology Monitor. United Nations Industrial Development organization. 1987/I (extraído de Mc. Graw Hills Biotechnology Newswatch. 1986. 3 Nov.)
12. Peter A. Lucke. Gene 1985. 37. 241-246
13. Walder, R. Hartley, J., Donelson, J. and Joseph A. Walder. Proc. Natl Acad. Sci. 1981. 78. No. 3 1503-1507.
14. Baksi, K. and G. Rushizky. Anal. Biochem. 1979. 99, 207-212
15. Brown, D. Sci. Am. 1973. 229: 20-29.
16. Gilbert, W., and Maxam, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1973. 70; 3581-3584
17. Dickson et al., Science. 1975. 187:27

18. Donna, K., and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. 68; 2913
19. Roberts, R., Crit. Rev. Biochem. 1976. 4: 123-164
20. Smith et al. J. Mol Biol. 1970. 51: 379
21. Bolivar et al 1977. Gene 2. 95-113
22. Bolivar, F. 1978. Gene 4, 121-136
23. Sgarbella et al. 1970. Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 1468-1475