

Enzimas de restricción de bacterias nativas de Nicaragua

Ian Roustán-Espinosa*, Douglas Guerrero*, Ernesto Flores* y Jorge Huete-Pérez*

Resumen.- Los avances de la ingeniería genética y la biología molecular han propiciado la utilización de bacterias en la industria biotecnológica. En este trabajo se presenta la identificación y caracterización de enzimas de restricción presentes en bacterias recolectadas en medios acuosos de Nicaragua. Se encontró actividad de restricción en el 25% del total de bacterias analizadas. Se abordan los procesos de purificación de extractos de proteínas de bacterias con actividades de Sau96I y PvuII. Este trabajo es un esfuerzo dirigido a la implementación de técnicas modernas de biotecnología en Nicaragua.

Introducción

La utilización de microorganismos en la producción de alimentos tuvo un auge importante en los últimos cien años, principalmente con el manejo y dominio de los procesos fermentativos de la levadura, hongos y bacterias. Más recientemente, los avances de la ingeniería genética y la biología molecular han propiciado la utilización de microorganismos para la producción de metabolitos importantes, especialmente para aplicaciones de interés farmacéutico y biotecnológico.

Las bacterias constituyen el grupo de microorganismos unicelulares más numeroso y también el más diverso: existen más de diez mil especies diferentes distribuidas prácticamente en cualquier ambiente en donde han sido buscadas. La facilidad para cultivarlas y manipularlas, y su crecimiento rápido son algunas de las características que han permitido la

utilización de las bacterias en procesos biotecnológicos de gran importancia comercial, como producción de hormonas, compuestos antivirales, enzimas, vacunas y otros productos.

Muchas de las técnicas utilizadas en biología molecular, se basan en propiedades y procesos que ocurren naturalmente en bacterias, sus genes y enzimas. El descubrimiento de las enzimas de restricción en bacterias es, sin dudas, uno de los hallazgos de mayor impacto en la ingeniería genética de la segunda mitad del siglo pasado.

Las enzimas de restricción (nucleasas) catalizan la hidrólisis de los enlaces diéster fosforilados, lo cual libera residuos de nucleótidos en varios sitios dentro de la cadena de polinucleótidos que forman la estructura del ADN (Horton, *et. al*, 1996). Son enzimas que producen cortes en dicha estructura en ciertos puntos específicos haciendo más fácil su estudio y su manejo.

* Investigadores del Centro de Biología Molecular - UCA

La mayoría de estas enzimas provienen de bacterias. Organizativamente, forman parte de un sistema conocido como de restricción y metilación, en donde la contraparte la integra una enzima metilasa. Los sistemas de restricción/metilación se clasifican en cuatro tipos, basándose en las propiedades de las enzimas puras. El tipo II de las enzimas de restricción es el grupo más estudiado y el que presenta el mayor número de enzimas con que se cuenta.

Se piensa que la función de estas enzimas es la de servir como una especie de sistema inmunológico para la célula que las posee, puesto que hay evidencia de producción de enzimas de restricción para la digestión de ADN extraño al microorganismo. La importancia de este tipo de enzimas en el campo de la investigación es grandiosa, y va desde su implemento para la creación de mapas de restricción de ADN o servir de modelos espléndidos para las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, hasta su uso en el campo de la tecnología de ADN recombinante.

A la fecha se han identificado unas dos mil enzimas de restricción, de las cuales se ha clonado un 10%. La búsqueda e identificación de enzimas de restricción nuevas tiene implicaciones tanto comerciales como en la ingeniería genética. Dada la riqueza de biodiversidad de Nicaragua, puede esperarse una enorme variedad de microorganismos, inclusive de bacterias, que pueden contener un sinnúmero de propiedades interesantes y de enzimas de restricción hasta ahora desconocidas.

Casi todas las enzimas de restricción conocidas se encontraron mediante un rastreo aleatorio de microorganismos. En los estudios de bacterias realizados en los laboratorios de la Universidad Centroamericana (UCA), se ha incluido la identificación de enzimas de restricción presentes en microorganismos nativos de Nicaragua. Con este trabajo se trata de contribuir en la aplicación de la biotecnología en nuestro país.

Materiales y métodos

Las enzimas de restricción y los tipos de ADN usados para comparaciones e identificación de las enzimas presentes en los extractos crudos de muestras bacterianas se obtuvieron de New England Biolabs, Inc., Estados Unidos. Todos los búferes usados para las digestiones en los ensayos se compraron también de New England Biolabs, Inc. La enzima KpnI y el bufer TBE (0.89 M Tris, 0.89 M Ácido Bórico, 0.02 M EDTA Disodio pH 8.4) se adquirieron de Boehringer Mannheim, Alemania. El bufer de lisis (0.1 mM EDTA, 10mM KH₂PO₄ con una concentración final de 0.1mg/ml de PMSF) al igual que el buffer de equilibrio (20mM Tris, 0.1mM EDTA, 50mM NaCl pH 7.5) usado para la purificación de las enzimas presentes en las muestras se prepararon en los laboratorios de la UCA a partir de los componentes iniciales. El bufer Stop (0.25% Bromofenol blue y 30% glicerol en agua) se usó para detener las digestiones. La Celulosa DEAE (intercambiador de aniones, D-8382 y con capacidad de 0.85meg/g) que se utilizó para la columna de purificación se obtuvo de Sigma, Estados Unidos.

El medio de cultivo utilizado para crecer las bacterias fue el LB Broth, Miller (cloruro de sodio, triptona y extracto de levadura). Este medio se obtuvo de Fisher Biotech, Estados Unidos. La Agarosa para geles de electroforesis se adquirió de Gibco BRL. Se utilizó la solución de Bradford (agua destilada, 95% etanol, 88% ácido fosfórico y Serva Blue G) para el proceso de determinación de la concentración de proteínas. Para todos los procesos y preparación de reactivos se procuró utilizar agua bidestilada o agua deionizada.

Las muestras de bacterias se recogieron en diferentes áreas de Managua: Nejapa (Carretera Vieja a León), Volcán Mombacho; diferentes lugares de la Carretera a Masaya y de alrededores de la Universidad Centroamericana (UCA). Las muestras eran de orígenes diversos: desde muestras de suelos y agua, hasta muestras obtenidas de ciertos insectos o debris, hojas u otros materiales orgánicos. Cada muestra se inoculaba en un plato Petri con LB/agar sólido y se dejaba durante un período de incubación de 12-16 hrs. Cuando las colonias de bacterias eran final y distintivamente diferenciadas, se crecían una de cada tipo por separado en 10 ml de solución de LB y dejadas a 30°C en un agitador por la noche por un período de 12-16 horas.

Los cultivos individuales de células se centrifugaron a 4,000 r.p.m. por 20 minutos. El pellet de células se colocó en hielo y se resuspendió con bufer de lisis conteniendo PMSF, un inhibidor de proteasas. Esta nueva solución se trasladó a un microtubo de centrifugación para sonicación durante

cinco períodos de 25-30 segundos cada uno. Cada período se seguía con una etapa de enfriamiento en hielo por dos minutos. En todo este proceso las muestras se mantenían el máximo de tiempo posible en hielo. Posteriormente se centrifugaba a 14,000 r.p.m. por siete minutos.

En esta ocasión, el supernatante es utilizado y el precipitado es descartado. De esta solución se toma una alícuota para el ensayo de digestión. En este proceso se utilizaron dos tipos de ADN (Lambda y T7). Dichos tipos de ADN eran expuestos a la presencia de cierta cantidad de extracto crudo en bufer para digestión. El ensayo era dejado en el incubador por una hora a 37°C. Al término de este período de incubación se detenía la digestión con bufer Stop. La digestión se analizaba en geles de Agarosa por electroforesis. Los geles se fotografiaban en una cámara digital para su análisis posterior.

A las muestras que presentaron actividad de restricción se les realizaron análisis de digestiones combinadas usando enzimas comerciales como: Kpn I, Bgl II, Eco RI, entre otras. Cuando era necesario, se purificaban las enzimas del extracto crudo a través de una columna de celulosa DEAE. Para eluir las proteínas se utilizó un gradiente de NaCl desde 50 mM hasta 2 M. Alícuotas de todas las fracciones se sometían a digestión para determinar las fracciones que presentaban la actividad.

Se hizo análisis de espectrofotometría para medir las concentraciones de proteína. Para este fin se utilizó el método Bradford (Bollag, *et al*, 1976).

1976) La absorbancia se midió a una longitud de onda 595 nm.

Las bacterias que presentaron actividad enzimática se caracterizaron para identificación y morfología por el método de Gram. Una muestra del cultivo bacteriano se coloca en un porta objeto y se fija mediante calor. Después, por períodos de un minuto, se van enjuagando las muestras con cristal violeta primero y luego con yodo, alcohol 90%, y por último con safranina. La determinación de los resultados se hace por la coloración que presentan las bacterias.

Las muestras de bacterias fueron inoculadas en los medios de cultivo, Mac Conkey, Hierro Tres Azucres (TSI), Lisina Desaminasa (LIA), Citrato, y Motilidad-Indol-Ornitina (MIO) y se incuban por 18-24 horas. Posteriormente se realiza la lectura según su crecimiento en dichos medios de cultivo.

Resultados y discusión

En este trabajo se examinaron un total de 88 muestras de bacterias. De éstas, 66 se obtuvieron de medios sólidos como muestras de tierra, corteza de árboles, excremento de aves, semillas, hojas, musgos, hongos. Se estudiaron 14 muestras de insectos (cucarachas, mosquitos, escarabajos), tanto de la superficie de sus cuerpos como de bacterias presentes en sus tractos digestivos. El resto de las muestras (ocho) provinieron de charcos de agua y fuentes. Se encontró actividad de restricción en el 25% del total de bacterias analizadas.

El asunto primario en la detección de una enzima de restricción en el extracto crudo de proteínas de bacterias es la observación de digestión de ADN en geles de agarosa. En este estudio se utilizó ADN lambda y T7 para rutina. En este paso, varios factores pueden interferir con la detección de la presencia de una actividad de restricción en los extractos crudos de las muestras. Uno de éstos puede ser la concentración de proteínas contaminantes en el extracto crudo. Al inicio de las investigaciones, éste fue un problema grave que impidió registrar actividad en la mayoría de los extractos de bacterias. Se determinó que la concentración del extracto crudo era demasiado alta llegando a un nivel de aproximadamente 6 mg/ml. Se decidió modificar el protocolo de modo que la concentración final de proteínas en los extractos fuese de 0.5 mg/ml.

Otro factor que también interfirió con la detección enzimática fue la presencia de exonucleasas y endonucleasas inespecíficas que cortan el ADN sin patrones predeterminados y que causan degradación completa o parcial del ADN. Un factor adicional contaminante es la presencia de grandes cantidades de ARN en las muestras bacterianas que interfieren en la determinación de la actividad de las enzimas en los extractos. La modificación de la concentración de proteínas también contribuyó en disminuir la afectación de las nucleasas en los extractos.

Otro paso importante es la caracterización del tipo de restricción observada, lo que se realiza mediante comparación de patrones de restricción

en otros tipos de ADN y en digestiones duplas en las que se incluyen enzimas conocidas. Para mayor caracterización se usó además ADN de pUC19, pBR322 y 174.

La mejoría del protocolo en la detección de actividades enzimáticas de restricción se puede observar en la cuadro 1. Se detectó actividad de restricción en análisis de rutina en 15 muestras de bacterias a partir de un total de 60, para un porcentaje de 25%. La gran mayoría de extractos tienen actividad en casi todos los ADN utilizados.

En algunos casos, para caracterizar las enzimas de restricción se hace necesario purificar el extracto crudo para eliminar las nucleasas contaminantes. Para los fines de este trabajo se ha establecido un protocolo simple de purificación que consiste en un solo paso de cromatografía de intercambio iónico en una columna pequeña de DEAE-celulosa. Las proteínas se eluyen por gradiente de 50mM a 2M de NaCl, y las fracciones se someten a digestión para determinar en cual de ellas se encuentra la actividad de restricción.

Cuadro 1
ACTIVIDAD DE RESTRICCIÓN EN EXTRACTOS CRUDOS DE BACTERIAS

Muestra	Tipos de ADN			
	Lambda	pBR322	pUC19	Phi 174
001	+	+	+	ND
002	ND	ND	ND	ND
005	+	+	ND	ND
006	ND	+	+	+
008	+	+	+	ND
009	ND	+	+	+
011	+	+	+	+
012	+	+	+	+
013	+	+	+	+
015	ND	+	+	ND
017	+	+	+	ND
020	ND	ND	+	+
021	+	+	+	ND
024	+	+	+	ND
025	+	+	+	+

ND: no se detecta actividad.

En algunos casos, para caracterizar las enzimas de restricción se hace necesario purificar el extracto crudo para eliminar las nucleasas contaminantes. Para los fines de este trabajo se ha establecido un protocolo simple de purificación que consiste en un solo paso de cromatografía de intercambio iónico en una columna pequeña de DEAE-celulosa. Las proteínas se eluyen por gradiente de 50mM a 2M de NaCl, y las fracciones se someten a digestión para determinar en cual de ellas se encuentra la actividad de restricción.

Aquí se presenta como ejemplo el análisis completo para dos muestras. En la ilustración 1 se presentan los resultados de la purificación de un extracto de bacteria cuya actividad se determinó como Sau96I. Durante la purificación por DEAE-Celulosa, la actividad de Sau 96I eluye con molaridad de NaCl entre 70mM y 95mM que corresponde a las fracciones tres y cuatro.

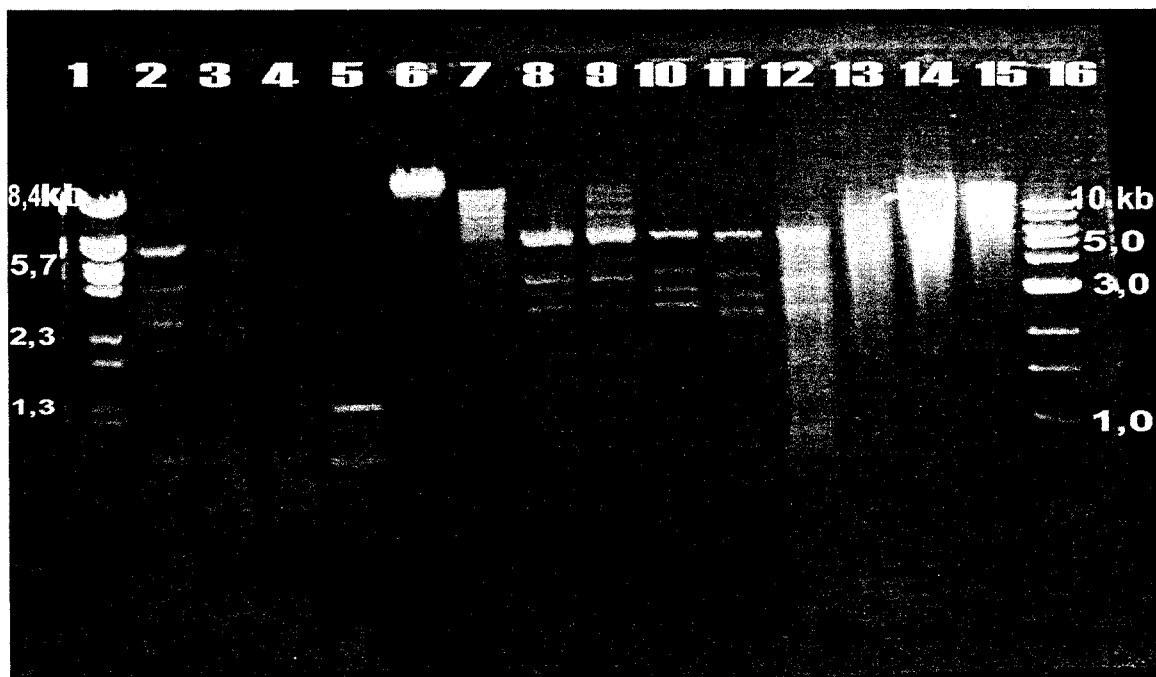


Ilustración 1. Purificación y caracterización de la actividad enzimática Sau 96I en Lambda ADN. (1) marcador (digestión de BstE II en Lambda ADN), (2) Sau 96I comercial, (3) extracto crudo original, (4) extracto crudo inyectado (diluido), (5) extracto crudo sin ADN, (6) fracción no ligada, (7) lavado, (8) fracción 1, (9) fracción 2, (10) fracción 3, (11) fracción 4, (12) fracción 5, (13) fracción 6, (14) fracción 7, (15) fracción 8, (16) marcador 1Kb ladder.

En la ilustración 2, se presenta la purificación y determinación de la actividad de PvuII en otra bacteria. En este caso, la actividad de Pvu II eluye entre 700mM y 1M, que corresponde a las fracciones 4 y 5.

Para la caracterización de las actividades de restricción se recurrió también a restricciones producidas en programas de computadoras. La aplicación de programas de computadora y la gran cantidad de bases de

datos con que se dispone son herramientas muy útiles en la tecnología para caracterización de sitios de reconocimiento. Adicionalmente, los métodos bioquímicos son necesarios para verificación del mismo sitio.

Las bacterias que presentaron estas actividades de restricción se caracterizaron también por Gram y bioquímicamente (ilustración 3).

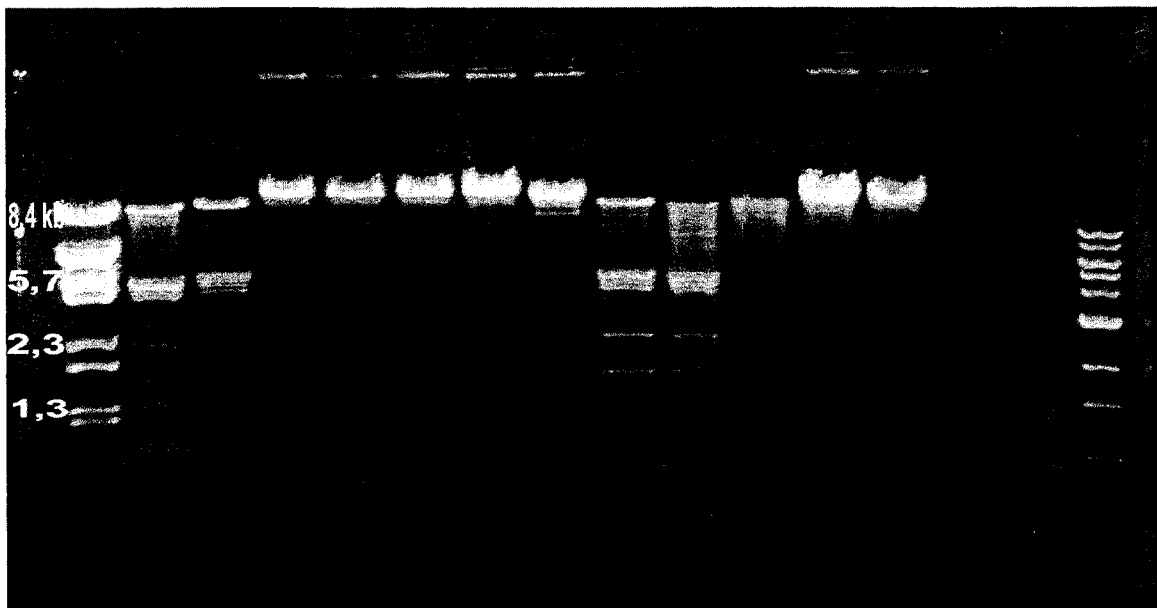


Ilustración 2. Purificación y Caracterización de la actividad enzimática Pvu II en Lambda ADN: (1) marcador (digestión de BstE II en Lambda ADN), (2) extracto crudo original, (3) Pvu II comercial, (4) fracción no ligada, (5) lavado, (6) fracción 1, (7) fracción 2, (8) fracción 3, (9) fracción 4, (10) fracción 5, (11) fracción 6, (12) fracción 7, (13) fracción 8, (14) bufer, (15) extracto sin ADN, (16) marcador 1Kb ladder (tamaño de bandas en la primera ilustración).

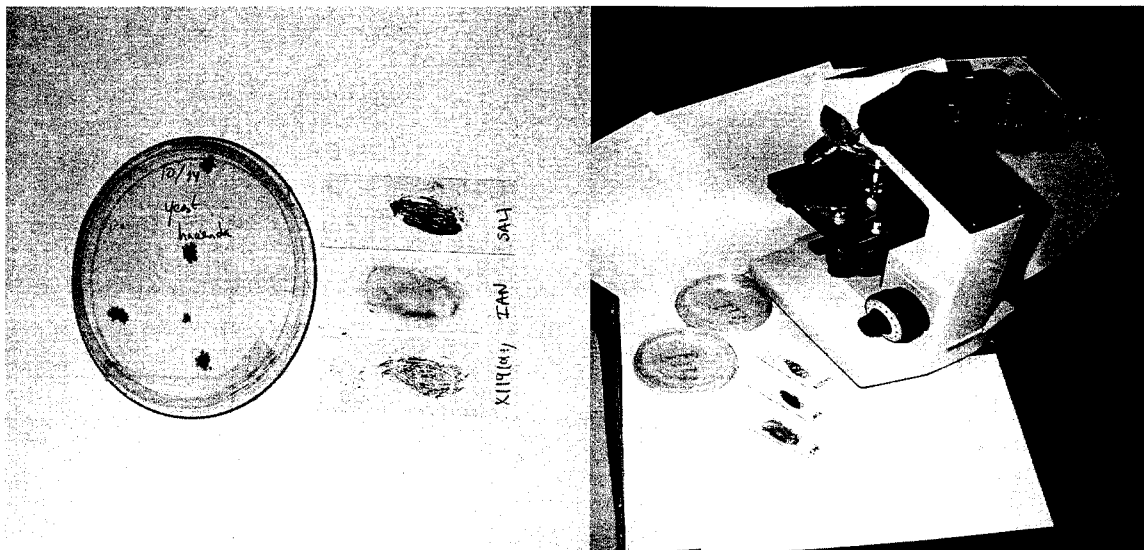


Ilustración 3. Las bacterias que presentaron actividad de restricción se aislaron y se observaron al microscopio. Por tinción de Gram se identificaron formas de bacilos y cocos.

Ambas muestras resultaron ser Gram negativas. En cuanto a la morfología, la que presentó Sau 96I es un bacilo y la de Pvu II tiene forma de coco. Las muestras presentaron el siguiente comportamiento (cuadro 2).

Estos resultados llevan a la conclusión que la muestra de bacilos (actividad Sau 96I) se encuentra una bacteria del género *Escherichia*, spp., y en la muestra de cocos (actividad Pvu II) se encuentra una bacteria del género *Tatumelia*, spp. Ambas bacterias fueron caracterizadas como de vida libre.

Los medios de cultivo a nuestra disposición y que se utilizaron en este

estudio son apropiados para identificación de bacterias de importancia clínica. En adelante, se podría mejorar la caracterización de estas muestras usando medios para bacterias de vida libre.

Las enzimas de restricción tienen aplicaciones tanto académicamente como en la industria biotecnológica. Son herramientas indispensables en la ingeniería genética y proveen un modelo para las interacciones entre ADN y las proteínas. Esta investigación significa también la posibilidad real de generar productos de interés biotecnológico a partir de la gran riqueza biológica de nuestro país.

Cuadro 2
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE DOS MUESTRAS CON
ACTIVIDAD DE RESTRICCIÓN

Reacciones en los medios de cultivo	Bacilos	Cocos
Glucosa	-	+
Lactosa	+	-
Sacarosa	-	+
Lisina	+	+
Motilidad	+	-
Indol	+	-
Ornitina	+	+
Citrato	+	+

Agradecimiento

Este trabajo de investigación contó con el apoyo de la *Fundación New England Biolabs*.

El Centro de Biología Molecular de la UCA es financiado por la *Pew Charitable Trusts* (grant PO114SC).

Bibliografía

- BOLLAG, D. M. *et.al*, (1996). *Protein Methods*. New York. Wiley - Liss Publication. 2nd Edición.
- HORTON, H.R. *et.al*, (1996). *Principles of Biochemistry*. New Jersey. Simon and Schuster/ Viacom Company. 2nd Edición.
- SCHILDKRAUT, I. (1997). "Screening for and characterizing Restriction Endonucleases". Comunicación Personal.
- TAMARIN, R. H. (1993). *Principles of Genetics*. Iowa. Wm. C. Brown Publishers. 4th Edición.
- WILSON, G. (1993). "Restriction Enzymes: A Brief Overview". *The NEB Transcript*. Vol. 5. No 1. Páginas 1-5. Beverly.