

## II.D.- MÉTODOS DE DNA RECOMBINANTE

### II.D.1.- Secuencia clonada de la glucanasa silvestre

```

181          5' -TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTTG
          3' -AACACTCGCC TATTGTTAAA GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTCGAAC
          RUP                               Hind III
Sph I
241 CATGCTGACA TTCTCTACAC CAAATTCTTG AAACAAAGAG AAAGCGACCT CTTCAATTTT CTTTCCAATA
   GTACGACTGT AAGAGATGTG GTTTAAGAAC TTTGTTTCTC TTTCGCTGGA GAAGTTAAAG GAAAGGTTAT
311 TCCTTTTCCA TGATGCTTCA CCTTCTTTAC CTTTATCCAC CTTGCACGTA TCTCTATGTG TAAATCAAAT
   AGGAAAAGGT ACTACGAAGT GGAAGAAATG GAAGTAGGTG GAACGTGCAT AGAGATACAC ATTTAGTTTA
381 TTCTTTTCAAT TTCATTAGGA CAATTGTACC GGTATTATCT TACGGACAAC TGTCGCTTTG TCAATCATTA
   AAGAAAGTAA AAGTAATCCT GTTAACATGG CCATAATAGA ATGCCTGTTG ACAGCGAAAC AGTTAGTAAT
451 TTTTTTACCT ATCAATTTTC TTTTCATTGT ATTAACAAAA CACACTGTTT ATCATTATTT AGACCGATTT
   AAAAAATGGA TAGTTAAAAG AAAAGTAAGA TAATTTTTTT GTGTGACAAA TAGTAATAAA TCTGGCTAAA
          -35                               -10                               RBS                               gen bgl
521 TCCATTTTGA GAGAATCATG TATGATCAAA AAGAAAACGC TTTCAAAAAA GAGAGGGGAA TGCCTACATG
   AGGTAAACT CTCTTAGTAC ATACTAGTTT TTCTTTTTCG AAAGTTTTTT CTCTCCCTT ACGGATGTAC
591 TCTTACCGTG TAAAACGAAT GTTGATGCTG CTTGTCCTG GATTATTCTT AAGTTTGTCC ACATTTGCTG
   AGAATGGCAC ATTTTGCTTA CAACTACGAC GAACAGTGAC CTAATAAGAA TTCAAACAGG TGTAACGCAC
661 CAAGTGCCTC GGCACAAACG GCGGGTTCGT TTTATGAACC GTTCAACAAC TATAATACGG GGTATGGCA
   GTTCACGGAG CCGTGTTCG CCGCCAGCA AAATACTTGG CAAGTTGTTG ATATTATGCC CCAATACCGT
731 AAAAGCAGAT GGGTACTCGA ATGGAAACAT GTTTAACTGT ACGTGGCGTG CAAACAATGT CTCCATGACG
   TTTTCGTCTA CCCATGAGCT TACCTTTGTA CAAATTGACA TGCACCGCAC GTTTGTTACA GAGGTACTGC
801 TCGTTAGGGG AAATGCGATT ATCGCTCACA AGTCCTTCTT ATAATAAGTT TGACTGCGGA GAAAACCGCT
   AGCAATCCCC TTTACGCTAA TAGCGAGTGT TCAGGAAGGA TATTATTCAA ACTGACGCCT CTTTTGGCGA
871 CCGTTCAAAC GTACGGCTAT GGGCTATATG AAGTCAACAT GAAACCAGCC AAAAATGTTG GGATCGTGTG
   GGCAAGTTTG CATGCCGATA CCCGATATAC TTCAGTTGTA CTTTGGTCGG TTTTACAAC CCTAGCACAG
941 TTCGTTCTTT ACTTATACGG GACCGACTGA TGGTACGCCT TGGGATGAAA TCGACATCGA ATTTCTAGGA
   AAGCAAGAAA TGAATATGCC CTGGCTGACT ACCATGCGGA ACCCTACTTT AGCTGTAGCT TAAAGATCCT
1001 AAAGATACGA CAAAGGTTCA GTTTAATTAT TATACCAATG GTGTCGGAAA TCATGAAAAA ATCGTCAACC
   TTTCTATGCT GTTTCCAAGT CAAATTAATA ATATGGTTAC CACAGCCTTT AGTACTTTTT TAGCAGTTGG
1081 TTGGTTTTGA TGCAGCAAAC TCTTATCACA CATATGCGTT CACTGGCAG CCTAACTCAA TTAATGGTA
   AACCAAACT ACGTCGTTT AGAATAGTGT GPATACGCAA GCTGACCGTC GGATTGAGTT AATTTACCAT
1151 TGTGGACGGT CAATTTAAAC ATACGGCTAC TACTCAAATC CCTCAAACAC CGGGAAAGAT TATGATGAAC
   ACACCTGCCA GTTAATTTTG TATGCCGATG ATGAGTTTAT GGAGTTTGTG GCCCTTCTA ATACTACTTG
1221 TTATGGAATG GTGCAGGTGT CGATGAATGG CTCGGCTCCT ACAACGGTGT TACTCCACTT TACGTCATT
   AATACCTTAC CACGTCCACA GCTACTTACC GAGCCGAGGA TGTGCCACA ATGAGGTGAA ATGCGAGTAA
1291 ACAATTGGGT GCGTTACACA AAAAGATAAC CACATCACAA AACCTGTGAC AAGTCACAGG TTTTTCTTCA
   TGTTAACCCA CGCAATGTGT TTTTCTATTG GTGTAGTGTT TTGGACACTG TTCAGTGTCC AAAAAGAAGT
          Sac I   EcoR I
1361 TTTAAATAGA GCTCGAATTC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT GCGGTTACCC
   AAATTTATCT GAGCCTTAAG TGACCGGCAG CAAAATGTTG CAGCACTGAC CCTTTTGGGA CCGCAATGGG
          FUP
1431 AACTTAATCG CTTGTCAGCA CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCCC GCACCGATCG
   TTGAATTAGC GGAACGTCGT GTAGGGGGAA AGCGGTCGAC CGCATTATCG CTTCTCCGGG CGTGGCTAGC

```

**Figura II.2.:** Inserto contenido en el plásmido pUC119, conocido como pD6-2 (Planas *et al.*, 1992).

### II.D.2.- Normas básicas en la manipulación de DNA

Utilizar siempre material estéril, tanto las puntas como los eppendorfs, o autoclavarlo si no lo fuese. Manipular el material usando guantes, procurando siempre trabajar en las condiciones más estériles posibles.

### II.D.3.- Constructo con el que trabajamos

El plásmido que actualmente utilizamos y sobre el que hemos realizado la inmensa mayoría de las mutagénesis y expresión es el pD6-2. En él la glucanasa está clonada en un PUC119 insertando un fragmento de 1.2 kb de DNA proveniente de *B. licheniformis* cortado con sph I y Sac I que contenía el propio promotor de *Bacillus*. Este promotor es de hecho es el que se usa para expresar la proteína.

### II.D.4.- Obtención de DNA plasmídico por lisis alcalina

Este protocolo se usa para obtener DNA plasmídico para digestiones con enzimas de restricción, para usar como molde en los PCRs, subclonajes y transformación. Se trata de una modificación del protocolo (Sambrook *et al.*, 1989) que a su vez se basa en el propuesto por Ish-Horowics y Burke (1981) y el de Birboim y Doly (1979).

El procedimiento aprovecha que a pH entre 12 y 12.5 el DNA lineal se desnaturaliza y el DNA circular covalentemente cerrado no, esto unido al uso de un detergente como el SDS (dodecil sulfato sódico), hace que la célula se lise. El DNA cromosómico se desnaturaliza, muchas proteínas forman complejos proteína-SDS.

Cuando neutralizamos la disolución con acetato sódico, el DNA cromosomal renaturaliza y agrega en una maraña insoluble junto a las membranas y paredes celulares de *E.coli*, gran parte de las proteínas con detergente y el RNA de alto peso molecular, quedando en disolución del DNA plasmídico.

Para eliminar el resto de proteína que puedan quedar en disolución se realiza una extracción con fenol y se precipita el DNA plasmídico con restos de RNA con etanol.

Para eliminar también el RNA de bajo peso molecular bastará con usar una RNAsa.

Disoluciones:

DISOLUCIÓN I:

Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA	10 mM

\*Ajustar pH a 8. Autoclavar y conservar a 4 °C.

DISOLUCIÓN II:

NaOH	0.2 M
SDS	1 %

\*Tiende a precipitar, por lo que es recomendable prepararlo justo antes de su uso.

DISOLUCIÓN III:

Acetato Potásico 5M	60 ml
Acido acético glacial	11.5 ml
H2O destilada	28.5 ml

Tampón TE:

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

#### II.D.5.- Procedimiento de obtención de DNA a pequeña escala

1. Tomamos 1.5 ml de cultivo, de la cepa transformada crecida en medio 2xYT con 50 µg/ml, en un Eppendorf y se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos en una microcentrífuga Eppendorf.
2. Eliminamos el sobrenadante por aspiración.
3. Resuspendemos el precipitado con 100 µl de Disolución I, por agitación usado un vortex.
4. Añadimos 200 µl de disolución II recién preparada a partir de soluciones madres de NaOH y SDS. Mezclar suavemente por inversión o usando la punta de la pipeta, evitar agitación violenta. Mantener en hielo durante 3 minutos.
5. Añadir 150 µl de Disolución III. Mezclar por inversión los tubos varias veces. Mantener en hielo 5 minutos.
6. Centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un Eppendorf nuevo.
7. Añadir 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isomílico (25:24:1), y agitar enérgicamente usando un vortex. Usar, en este paso, eppendorfs no autoclavados ya que los autoclavados están ligeramente deformados, y no son herméticos, es muy fácil perder parte del contenido durante la agitación.
8. Centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga durante 2 minutos y transferir a un Eppendorf nuevo la fase acuosa superior. Descartando tanto el fenol del fondo como la interfase proteica.
9. Para acabar de precipitar todas las proteínas repetir pasos 7 y 8.
10. Añadir al DNA plasmídico 2.5 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente

11. Centrifugar a 14000 prm en microcentrífuga durante 4 minutos.
12. Eliminar por aspiración el sobrenadante.
13. Lavar para eliminar exceso de sales y restos de fenol del DNA del precipitado con 500 µl etanol al 70 % a temperatura ambiente.
14. Eliminar por aspiración el sobrenadante.
15. Resuspender en 10 a 50 µl de TE con RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml. Agitar suavemente con el vortex y dejar 1 hora a 4°C para que se acabe de resustender todo el precipitado.
16. Conservar a -20 o -80 °C

El rendimiento para un plásmido de alto número de copias como en pUC119 es de entre 2 a 5 µg por ml de cultivo.

#### II.D.6.- Procedimiento de obtención de DNA a gran escala

1. Tomamos 12 ml de cultivo, de la cepa transformada crecida en medio 2xYT con 50 µg/ml, y la centrifugamos a 2500 g durante 10 minutos.
2. Eliminamos el sobrenadante por aspiración.
3. Resuspendemos el precipitado con 500 µl de Disolución I, por agitación usado un vortex, y transferir a un Eppendorf.
4. Centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga, y aspirar sobrenadante.
5. Resuspendemos el precipitado con 200 µl de Disolución I, por agitación usado un vortex.
6. Añadimos 400 µl de disolución II recién preparada a partir de soluciones madres de NaOH y SDS. Mezclar suavemente por inversión o usando la punta de la pipeta, evitar agitación violenta. Mantener en hielo durante 3 minutos.
7. Añadir 300 µl de Disolución III. Mezclar por inversión los tubos varias veces. Mantener en hielo 5 minutos.
8. Centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un Eppendorf nuevo.
9. Añadir 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isomílico (25:24:1), y agitar enérgicamente usando un vortex. Usar, en este paso, eppendorfs no autoclavados ya que los autoclavados están ligeramente deformados, y no son herméticos, es muy fácil perder parte del contenido durante la agitación.
10. Centrifugar a 14000 rpm en microcentrífuga durante 2 minutos y transferir a un Eppendorf nuevo la fase acuosa superior. Descartando tanto el fenol del fondo como la interfase proteica.
11. Repetir pasos 9 y 10.
12. Añadir al DNA plasmídico 2.5 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente
13. Centrifugar a 14000 prm en microcentrífuga durante 4 minutos.
14. Eliminar por aspiración el sobrenadante.
15. Lavar para eliminar exceso de sales y restos de fenol del DNA del precipitado con 500 µl etanol al 70 % a temperatura ambiente.
16. Eliminar por aspiración el sobrenadante.
17. Resuspender en 50 a 150 µl de TE con RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml. Agitar suavemente con el vortex y dejar 1 hora a 4°C para que se acabe de resustender todo el precipitado.
18. Conservar a -20 o -80 °C.

### II.D.7.- Mutagénesis Dirigida por amplificación de bandas, (método clásico)

Durante la tesis he usado varios métodos de mutagénesis dirigida, al principio usaba una variante que integraba varios procedimientos (Landt *et al*, 1990; Sharrocks y Shaw, 1992; Barik *et al*, 1993; Lai *et al*, 1993) puesta a punto por el grupo (Juncosa *et al.*, 1993b; Pons *et al.*, 1995<sup>a</sup>), usando la reacción encadena de la polimerasa. Partiendo de un dsDNA molde este método sólo requiere un cebador universal de secuenciación, flanqueado en sentido inverso y confluyente en la región a mutar.

Una reacción típica podría ser :

10 ìl Tampón Deep Vent  
 4 ìl dNTPs  
 5 ìl Oligonucleótido 5'3' (Stock 5 pM/ìl) Primer "Universal Primer"  
 5 ìl Oligonucleótido 3'5' (Stock 5 pM/ìl) Oligo Mutagénico  
 72 ìl de Agua  
 0.5 ìl Deep Vent

Realizar todo el proceso de mezclar los diferentes componentes en hielo para minimizar la actividad correctora de la Deep Vent que podría digerir parcialmente los oligos, hecho que podría contribuir a aumentar el número de silvestres por digestión de la región mutada del oligonucleótido. Después se ha de introducir rápidamente los eppendorf en el termociclador cuando este esté ya a 94 ° C.

La utilización de enzimas con actividad correctora a pesar de que hacen aumentar la proporción de silvestres en los cribajes reducen drásticamente el número de mutaciones extras (Gelfand & Sninsky, 1993).

Los ciclos del PCR que se usan son:

1 min:15seg	94 ° C	Desnaturalización
1 min	55 ° C	Hibridación ( <i>annelling</i> )
1 min:30seg	72 ° C	Extensión

Realizamos 30 ciclos, y acabamos con:

10min	72 ° C	Extensión de posibles amplificaciones parciales
-------	--------	---

El resultado de este PCR se corre en un gel de agarosa de alrededor del 1 % y se recorta la banda correspondiente al tamaño que queríamos amplificar (Hansen *et al*1993). Este fragmento corresponde a una amplificación entre nuestro oligo mutagénico y uno de los

“Universal Primer”. Con este fragmente y el “Universal Primer” que no usamos en la reacción anterior realizamos una nueva PCR.

Una reacción típica podría ser :

10  $\mu$ l Tampón Deep Vent  
4  $\mu$ l dNTPs  
5  $\mu$ l Oligonucleótido 5'3' (Stock 5 pM/ $\mu$ l) Segundo “Universal Primer”  
15  $\mu$ l de la banda purificada del anterior PCR  
62  $\mu$ l de Agua  
0.5  $\mu$ l Deep Vent

Usamos el mismo programa de PCR que en el caso anterior. Una vez amplificada la banda la recortamos y tras cortarla la insertamos en el plásmido abierto, ligando plásmido y banda a continuación.

El resultado de la ligación del DNA lo transformamos en TG1 usando placas de Petri con X-Gal, IPTG y ampicilina. Descartamos aquellas colonias de color azul, ya que no han incorporado nuestro inserto. También se puede detectar actividad específica en placa de  $\alpha$ -glucano con réplica. En caso de detectar actividad en la placa de  $\alpha$ -glucano, seleccionaremos su réplica en la otra placa de LB-ampicilina.

Una vez ya hemos detectado que nuestra proteína se ha clonado y es funcional, a no ser que la hayamos inactivado a proposito, pasamos ha hacer un cribaje más fino, que ha de acabar en la secuenciación.

Este método en su época representó una mejora considerable con respecto a procedimientos anteriores, hay procedimientos mucho más rápidos que permiten introducir mutaciones en un solo PCR y transformar directamente después de recortar una banda del gel.

#### II.D.8.- Mutagénesis Dirigida por PCR en un solo paso

Este método surgió como una variante al procedimiento descrito por Stratagene en su “kit QuikChange Site-Ditected Mutagenesis kit”.

Una reacción típica podría ser :

4  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (Concentración Stock 100 mM/ $\mu$ l)  
10  $\mu$ l Tampón Deep Vent  
4  $\mu$ l dNTPs

5  $\mu$ l Oligonucleótido 5'3' (Stock 5 pM/ $\mu$ l)  
5  $\mu$ l Oligonucleótido 3'5' (Stock 5 pM/ $\mu$ l)  
68  $\mu$ l de Agua  
0.5  $\mu$ l Deep Vent

La concentración final de MgSO<sub>4</sub> es de 6  $\mu$ m/ $\mu$ l.

Los ciclos de PCR que se usan son:

30 seg	94 ° C	Desnaturalización
1 min:30 seg	55 ° C	Hibridación ( <i>annealing</i> )
15 seg	72 ° C	Extensión

Realizamos 30 ciclos.

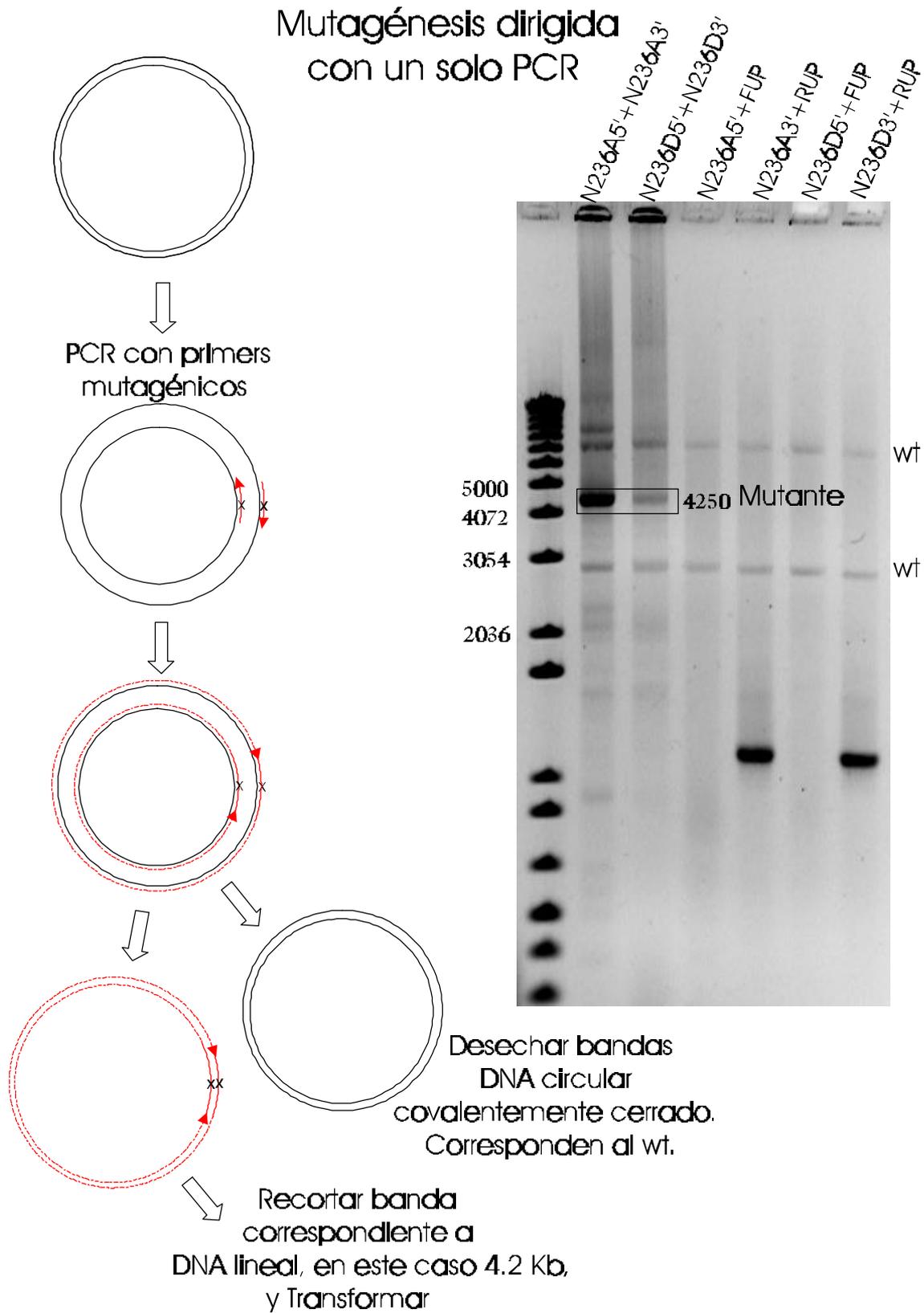
El tiempo de estos ciclos seguramente se puede reducir. Ahora bien, con estos tiempos la amplificación funciona. Uno de los puntos críticos es la cantidad inicial de DNA molde, se ha de ser generoso, ya que en este caso siempre que elongamos una cadena es porque los oligos mutagénicos se han fijado sobre el molde, es una amplificación lineal, no existe efecto multiplicativo.

Es interesante poner en la misma tanda de PCR otras reacciones con los oligonucleótidos mutagénicos el FUP o el RUP, según el caso, tal como aparece en la imagen que sigue. Esto nos permite comprobar que nuestros oligo realmente se unen específicamente al lugar que queremos mutar. También nos permite saber, como en este caso, que tenemos que cambiar nuestro stock de FUP que parece estar degradado, ya que no ha amplificado nada.

Si tuvieramos problemas y no viesemos ninguna banda podemos jugar aumentando la concentración de MgSO<sub>4</sub>, o usar DMSO al 1, 2, 3 ó 4 %.

Después recortamos la banda correspondiente al tamaño lineal del plásmido en el gel de agarosa, en este caso, al 1 %, y purificamos el DNA. Posteriormente transformamos. Si todo ha ido bien tendremos unas cuantas colonias para sequenciar o testar por digestión diferencial con el enzima silvestre si ha incorporado o no la mutación que queremos introducir.

Se puede incrementar la eficiencia de transformación ligando el plásmido lineal, una vez recortado del gel, previamente a la transformación. En nuestro caso no ha sido necesario ya que las transformaciones directa han dado lugar a más de diez colonias por placas de las cuales la mitad habían incorporado la mutación.



**Figura II.3.:** Esquema del procedimiento utilizado para la obtención de mutantes mediante termociclador, para obtener amplificaciones completas del plásmido, a partir de cebadores diseñados con las mutaciones que pretendemos introducir en el gen.

### II.D.9.- Selección de clones mutados

Suponiendo que hayamos tenido la precaución de introducir o eliminar una diana a la vez que nuestra mutación testar si se ha incorporado nuestra es muy fácil. Tomamos unos cuantos clones generados a partir de la transformación proveniente del PCR y hacemos una extracción de DNA y digerimos los diferentes clones. Obtendremos algo parecido al gel de la figura II.4.



**Figura II.4.:** Gel de agarosa, en el que se muestra un cribaje usando como criterio la incorporación de dianas de restricción Nsi I, de diferentes clones. Los clones del recuadro han incorporado la diana.

En este caso hemos introducido una diana Nsi I además de mutación N236A o N236D. Si no se ha incorporado la nueva diana al digerir con Hind III y Nsi I, solo Hind III cortará y tan sólo habremos linealizado el plásmido. Si también corta por Nsi I querá decir que ha incorporado la mutación que nosotros queremos introducir. En este caso seleccionamos los clones N236A<sub>2</sub> y N236D<sub>1</sub>.

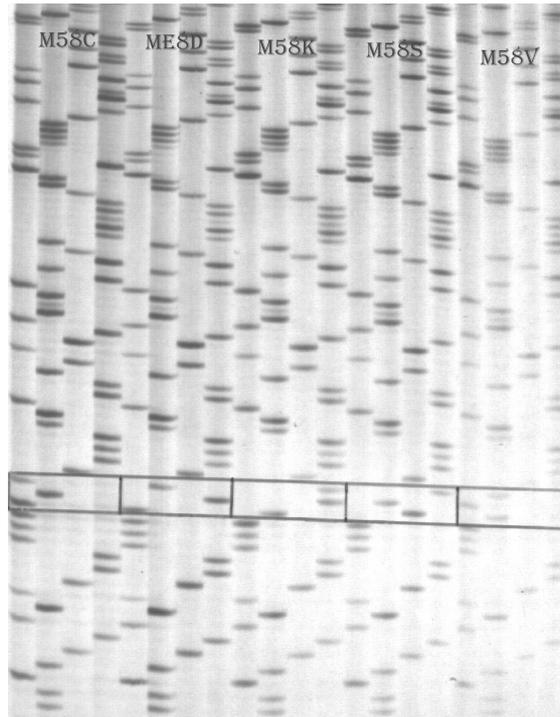
Ahora tan sólo resta confirmar por secuenciación que realmente nuestra mutación está hay y que no hay ninguna mutación extra más.

### II.D.10.- Secuenciación manual del DNA

Tanto los protocolos de secuenciación manual como los protocolos automáticos se han realizado usando kits comerciales. El kit de secuenciación manual con marcaje de azufre radiactivo fue Deaza G/A T7 sequecing Kit de Pharmacia actual.

Esta es la imagen típica de un gel de secuenciación manual revelado por autoradiografía.

El triplete en el que hemos introducido las mutaciones aparecen resaltadas por un recuadro.



**Figura II.4.:** Típico gel de acrilamida para secuenciación. En los recuadros aparecen los codones que se han cambiado para obtener los mutantes deseados.

#### II.D.11.- Secuenciación automática del DNA

Para la secuenciación automática se ha usado diferentes Kits a modo de ejemplo se puede citar el kit BIG DYE, ya que más o menos todos funcionan igual. Tan sólo se ha de seguir las indicaciones, un termociclador y llevarlo a un servicio de secuenciación para obtener los resultados.

## **II.E.- DETECCIÓN DE ACTIVIDAD EN PLACA**

### **II.E.1.- Test de actividad en placas con $\beta$ -glucano**

Se toman dos placas una con  $\beta$ -glucano y otra sin  $\beta$ -glucano, que servirán como réplica, ya que en el proceso de tinción y fijación dañan las células y ni tan siquiera es necesario hacer la tinción en condiciones estériles.

Se pican las colonias provenientes de una transformación previa, con replica, en ambas placas se dejan crecer a 37 °C durante 5-6 horas. La placa con  $\beta$ -glucano se tiñe con Congo-Red (Merck) al 1%, de 5-10 minutos. Esto tiñe la placa de rojo ya que el Congo-Red tiene la capacidad de unirse a azúcares de cadena ramificada como el  $\beta$ -glucano (Beguin, 1983). Pero en las zonas alrededor de las colonias productoras de  $\beta$ -glucanasa el  $\beta$ -glucano es digerido apreciándose un halo amarillo anaranjado.

Si se quiere saber una foto se puede aumentar el contraste para fotografiarlo fijando con acético al 10 % (V/V). De esta manera el rojo vira a azul oscuro.

## **II.F.- MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LA GLUCANASA**

### **II.F.1.- Normas básicas de inoculación e incubación de los cultivos**

El volumen del medio líquido era aproximadamente 1/5 respecto del volumen total del recipiente. Es decir, para un cultivo de 400 ml, usamos erlenmeyers de 2 litros. Esto permite una aireación y agitación correctas, ya que aun aireación deficiente hace que las células fermenten en lugar de respirar disminuyendo el número final de células que obtenemos en el cultivo.

En los cultivos en los que se usaba preinóculo, este era 1/100 del volumen de medio líquido al que se inoculaba. Ahora bien, aunque al principio esta fue la técnica más usada, después se cambio por la inoculación directa de dos colonias, provenientes de una placa de agar LB, usando palillos estériles. Los niveles de producción de proteína fueron muy similares.

Los cultivos se incubaron a 37 °C con una agitación de entre 200 y 300 revoluciones. Cuando el cultivo provenía de un preinóculo el tiempo de incubación rondaba entre 14 y 16 horas, nunca más. Si provenía de inoculación con palillos se podía dejar entre 18 y 20 horas. Superados estos tiempos aunque se produce más  $\beta$ -glucanasa comienzan a producirse procesos proteolíticos, con la aparición de cadenas proteicas pequeñas y lo que resulta más molesto; proteínas que copurifican con la  $\beta$ -glucanasa en la columna de intercambio catiónico. Tampoco hay que retirar el cultivo demasiado pronto ya que la máxima producción de  $\beta$ -glucanasa se da

ya en la fase estacionaria, siendo esta producción pequeña durante la fase exponencial del cultivo.

## II.F.2.- Producción de $\beta$ -glucanasa en TG1

Transformamos TG1 con nuestro constructo, es decir el pUC119 con el correspondiente mutante de la  $\beta$ -glucanasa clonado. Tomamos una única colonia mediante un escocés y la resembramos en una nueva placa. De esta última placa inoculamos dos colonias usando palillos estériles a 400 ml de medio 2SB con (100  $\mu$ g ampicilina/ml), en un erlenmeyer de 2 litros a 300 revoluciones por minuto durante unas 18-20 horas.

Centrifugamos el cultivo para separar el medio de las células a 4°C.

<b>Rotor</b>	<b>RPM</b>	<b>RCF</b>	<b>Tiempo</b>
GSA	13000	27500	15 min.
GS3	9000	13628	30 hora

Tanto en el sobrenadante como en el precipitado encontramos  $\beta$ -glucanasa, hay grupos que purifican a partir de la fracción intracelular, nosotros usamos preferentemente la extracelular, ya que así evitas la gran cantidad de proteínas presentes en *E.coli*; aunque también hay que decir que bastaría ponerlas a pH 3 para que la mayoría de proteínas de *E.coli* precipiten sin que pase lo mismo con la  $\beta$ -glucanasa intracelular.

## II.G.- PURIFICACIÓN DE LA GLUCANASA

### II.G.1.- Primera diálisis

Tomamos los 400 ml de sobrenadante y los introducimos en sacos Spectra/Por de tamaño de poro de 6000-8000, y como tampón de diálisis usamos acetato sódico 5 mM pH 5.5. Hemos de procurar una buena agitación y cambiar el tampón, al menos tres veces, cada 6 a 8 horas, realizando todo el proceso a 4°C para preservar la proteína. Para este menester usamos habitualmente un recipiente de 20 litros y una bomba que genera un flujo de unos 300 litros/hora.

Si todo ha ido bien, habremos retirado del sobrenadante gran parte de los restos de medio, apreciándose un aclarado del mismo, así como gran parte de las sales. El pH del sobrenadante será de 5.5. Si no es así lo podemos ajustar usando acético ya que normalmente el medio después de crecer las bacterias se basifica ligeramente. Ahora bien, si se ha tenido que ajustar el pH hay

que comprobar la fuerza iónica del mismo no supere 2 ms. Si la supera significa que la diálisis no ha ido bien y hay que continuar dializando. Ya que si pasamos el sobrenadante en estas condiciones no se fijará a la columna de intercambio iónico.

### II.G.2.- Centrifugado

Parte de las proteínas a este pH precipitan, por lo que resulta conveniente volver a centrifugar para hacer desaparecer la turbidez y así desechar proteínas que no nos interesan.

Centrifugamos el cultivo para separar el medio de las células a 4°C.

<b>Rotor</b>	<b>RPM</b>	<b>RCF</b>	<b>Tiempo</b>
GSA	13000	27500	45 min.
SS34	22000	50227	20 hora

### II.G.3.- Primera cromatografía

Utilizamos columnas Sep-Pak Accell Plus CM 35 cc de intercambio catiónico. Para cada mutante siempre hemos usado su propia columna, esto reduce los posibles riesgos de contaminación sobre todo si trabajamos con varios mutantes simultáneamente, en cuyo caso hemos de extremar las medidas tendentes a garantizar que no intercambiamos los mutantes.

Pasamos el sobrenadante por la columna del mutante sobre el que estemos trabajando. La  $\beta$ -glucanasa así como otras proteínas de *E.coli* y del medio se fijan al columna, pero en realidad las que se fijan son una pequeña parte del total.

A continuación lavamos los restos de medio no fijados a la resina con al menos 200 ml de tampón acetato sódico 5 mM a pH 5.5. Estas columnas admiten un flujo de 100 ml/hora.

Posteriormente eluimos la columna usando como tampón A acetato sódico 5 mM a pH 5.5 y como tampón B el mismo acetato sódico 5 mM a pH 5.5, pero a 1M NaCl. Para ello usamos un cromatógrafo con colector de fracciones GradiFrac (Pharmacia Biotech), que nos permite eluir la columna a un flujo controlado de 1.5 ml/min y con una curva lineal de tampón B, pasando de 0 % al 100 % de B al cabo de 300 ml. Recogemos las fracciones de 12 en 12 ml.

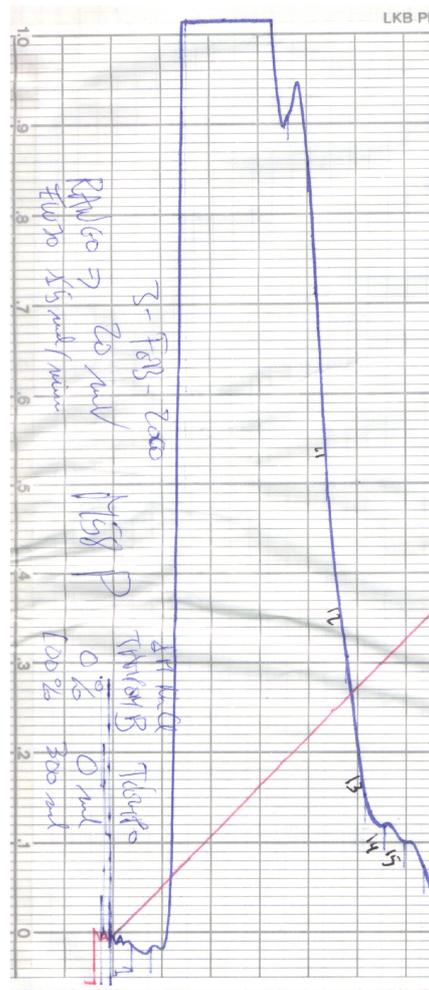
Normalmente, aunque puede variar ligeramente entre mutantes, al 45 % de B ya ha salido toda la  $\beta$ -glucanasa y podríamos parar hay la cromatografía. Pero por si acaso, y más si trabajamos con mutantes en los que hemos cambiado alguna carga que pudiese variar su perfil de elución, es mejor esperar a que el registro vuelva a registrar cero.

La figura II.5 es la típica salida, del registrador en papel continuo que obtenemos del Gradifrac, durante la elución de una columna Sep-Pak Accell Plus CM 35 cc cargada con 400 ml de medio después de la primera diálisis.

Este registro sólo nos dice que la columna funciona y a sido capaz de fijar una gran cantidad de proteínas; en su mayor parte de *E.coli* y del medio.

Durante la cromatografía solemos trabajar en un rango de 20 mV, que en realidad es un rango óptimo para la segunda cromatografía. Para que el registro de la primera cromatografía no se salga de rango en realidad se debería trabajar a 50 mV.

Al principio la temperatura de trabajo para cargar y eluir la columna era 4°C, básicamente para evitar la degradación de la proteína. Pero posteriormente cargando y eluyendo las Sep-Pak a temperatura ambiente no se apreció que la proteína se degradara excesivamente y se obtenía una buena resolución en la cromatografía. Evidentemente durante los tiempos de espera antes de cargar, después de cargar y antes de eluir y después de haberse eluido, se guarda la columna inmediatamente a 4°C.



**Figura II.5.:** Salida del registrador en papel continuo al eluir una columna Sep-Pak en la primera cromatografía.

#### II.G.4.- Lavado y reequilibrado de la columna

Una vez eluida la columna suelen quedar restos y se aprecia que la resina ha quedado teñida de un color amarillento propio del medio. Para eliminar cualquier resto de proteínas contaminantes lavamos la columna usando 10 ml de 1M NaOH, y la reequilibramos pasando 2 litros de tampón acetato sódico 5 mM a pH 5.5. Tras pasar todo el volumen comprobamos que realmente el flujo saliente este a pH 5.5. De esta manera la columna ya está preparada para la segunda cromatografía, la guardamos a 4°C hasta que la volvamos a usar.

#### II.G.5.- Detección de la actividad enzimática en disolución

Para esta detección se usa el método descrito por Hinchliffe (1984). Para ello se mide el cambio de color en el ácido dinitrosalicílico (DNS) por el incremento de los extremos reductores como consecuencia de la hidrólisis del  $\beta$ -glucano por la  $\beta$ -glucanasa.

#### II.G.6.- Protocolo en tubo de vidrio

Hasta que se empezó a determinar los parámetros cinéticos usando sustratos cromofílicos de bajo peso molecular, método mucho más reproducible, esta era la técnica usada. En la actualidad se usa para procedimientos de rutina como detectar la actividad enzimática en disolución pero no para determinar parámetros cinéticos.

1. Mezclar en el tubo 450  $\mu$ l una disolución de  $\beta$ -glucano de 5 mg/ml y 50  $\mu$ l de la dilución de enzima se incubaba a 45 °C. Normalmente proviene de un cultivo como comprobación de que ha habido producción en el cultivo. Se realizan varios puntos a diferentes tiempos (0 a 45 minutos) para poder determinar la actividad.
2. La reacción se para añadiendo 500  $\mu$ l de reactivo DNS, y se revela en un baño a 100 °C durante 10 minutos.

#### II.G.7.- Protocolo en microplaca

Presenta la ventaja de que se gasta muchísimo menos sustrato y proteína que con el procesamiento en tubo de vidrio y para saber si una fracción tiene o no actividad ya es suficiente.

1. Mezclar en el pocillo de la microplaca 125  $\mu$ l una disolución de  $\beta$ -glucano de 5 mg/ml y 10  $\mu$ l de la dilución de enzima incubándola en agitación a 45 °C. Normalmente la muestra de enzima proviene de una fracción de un pico de dilución de la columna de intercambio catiónico. Se pueden ensaya varios tiempos de incubación, pero en principio con 15 minutos para mutantes con una actividad proxima a la del silvestre ya es más que suficiente.
2. La reacción se para añadiendo 125  $\mu$ l de reactivo DNS, se tapan los pozos usados con celo y se revela en una estufa a 100 °C durante 20 minutos.

## II.G.8.- Control de pureza, primer SDS-PAGE

De aquellas fracciones en las que se ha encontrado actividad se realiza una electroforesis (Andrews, 1986) al 15 % de acrilamida, para determinar el grado de pureza en que se encuentra la  $\beta$ -glucanasa de las distintas fracciones.

Geles SDS-PAGE MiniProtean

Espaciador 0.8 mm

%	20	18	16	15	13	12	10	
<b>Buffer</b>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	<b>ml</b>
<b>H2O</b>	1.5	1.8	2.1	2.25	2.55	2.7	3	<b>ml</b>
<b>Acri/Bis *</b>	3	2.7	2.4	2.25	1.95	1.8	1.5	<b>ml</b>
<b>TEMED</b>	3	3	3	3	3	3	3	<b>ml</b>
<b>PSA 15 %</b>	24	24	24	24	24	24	24	<b>ml</b>

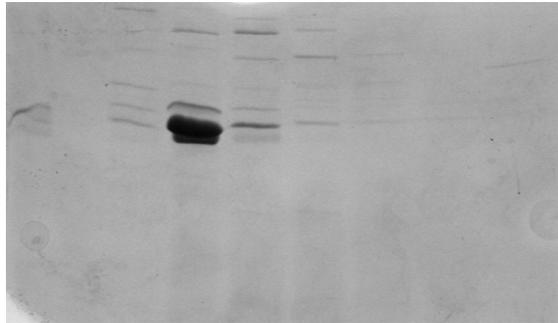
Espaciador 1,5 mm

%	20	18	16	15	13	12	10	
<b>Buffer</b>	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	<b>ml</b>
<b>H2O</b>	4.5	5.4	6.3	6.75	7.65	8.1	9	<b>ml</b>
<b>Acri/Bis *</b>	9	8.1	7.2	6.75	5.85	5.4	4.5	<b>ml</b>
<b>TEMED</b>	9	9	9	9	9	12	12	<b>ml</b>
<b>PSA 15 %</b>	72	72	72	96	96	120	120	<b>ml</b>

\* Relación acrilamida:bisacrilamida(37.5:1) al 40 %

Desechamos todas aquellas fracciones en las que la  $\beta$ -glucanasa no sea claramente la proteína mayoritaria, eliminando así una parte importante de las proteínas con un perfil de elución próximo a la  $\beta$ -glucanasa. También se aprecian claramente multitud de trazas proteínas de pequeño tamaño, figura II.6, ya sea de degradación de proteínas de *E.coli* o del medio.

La banda desdibujada del primer carril del gel de la figura II.6, es la propia glucanasa que se usa como proteína control, aunque esté bastante deformada.



**Figura II.6.:** Gel SDS-PAGE al 15 % de las fracciones con cierta actividad glucanásica.

Usando este gel como referencia tomamos aquellas fracciones que vemos más puras y deseamos aquellas en las que nuestra proteína no sea claramente mayoritaria.

#### II.G.9.- Segunda diálisis

De esta selección suelen obtenerse 1, 2 ó 3 tubos suficientemente puros, con lo que la proteína que inicialmente se encontraba en un volumen de 400 ml ha pasado a un volumen de entre 12 a 46 ml.

Esta nueva diálisis tiene la función de retirar las sales. Además si con la electroforesis conseguimos eliminar las proteínas que copurifican con la  $\beta$ -glucanasa, sobre todo las de alto peso molecular, las de bajo peso molecular las eliminamos con esta diálisis con sacos Spectra/Por de tamaño de poro de 6000-8000.

En un vaso de precipitados de 2 litros ponemos tampón de acetato sódico 5 mM pH 5.5. Para agitarlo podemos usar un agitador de barilla magnética. Hemos de cambiando el tampón tres veces cada 4 a 6 horas. Se aconseja realizar todo el proceso a 4°C.

#### II.G.10.- Segunda cromatografía

Esta segunda cromatografía se realizaba al principio con una columna de intercambio catiónico, en concreto una LKB UltroPac TSK CM-3SW lavada con 100 ml del tampón 0.4 M NaCl, 5 mM acetato sódico a pH 5.6, equilibrándola con 300 ml de tampón 5 mM acetato sódico a pH 5.6. Una vez cargada la proteína, la eluimos. Para eluirla usamos dos tampones, el tampón A es 5 mM acetato sódico pH 5.6, y el tampón B 0.4 M NaCl, 5 mM acetato sódico pH 5.6. Esta columna permite un flujo de 4 ml/min. En el minuto 0 el tampón en la mezcla B es del

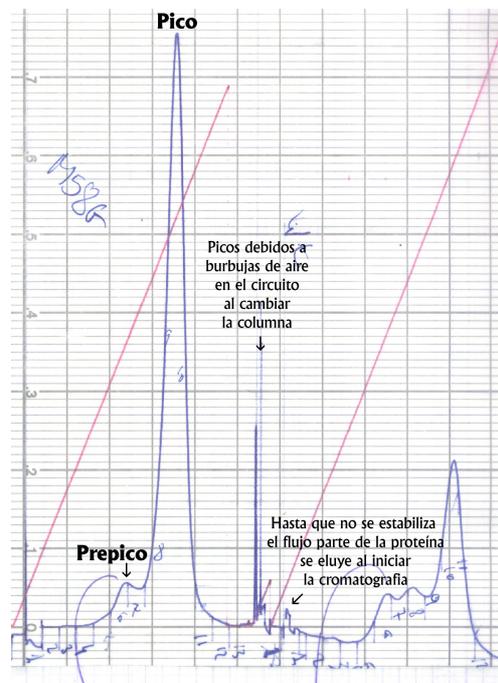
0 %, a los 15 minutos alcanza, siempre siguiendo una progresión lineal, el 20 %. Desde el minuto 15 al 60 la pendiente se hace menos acusada, para resolver mejor la glucanasa, subiendo hasta el 30 % de tampón B.

Cuando esta columna dejó de funcionar se cambió ligeramente el protocolo para poder hacer la cromatografía usando las mismas columnas de la primera cromatografía. Las columnas, Sep-Pak Accell Plus CM, se lavaban con 10 ml de 1M NaOH, y equilibrada con 2 litros de tampón acetato sódico 5 mM a pH 5.6. También se podían usar columnas Sep-Pak Accell Plus CM nuevas, a las que bastaba pasar 300 ml de tampón acetato sódico 5 mM a pH 5.5 para equilibrarlas.

Cargamos en la columna la proteína proveniente de la diálisis después de la primera tanda de purificación.

Eluimos la muestra al igual que hicimos en la primera cromatografía a un flujo controlado de 1.5 ml/min y con una curva lineal de tampón B, pasando de 0 % al 100 % de B al cabo de 300 ml, recogiendo las fracciones de 12 ml.

En este caso ya no es necesario hacer la actividad de las fracciones que estamos eluidas, ya que los picos en esta cromatografía suelen estar bien definidos. Además la glucanasa ahora es la proteína mayoritaria.



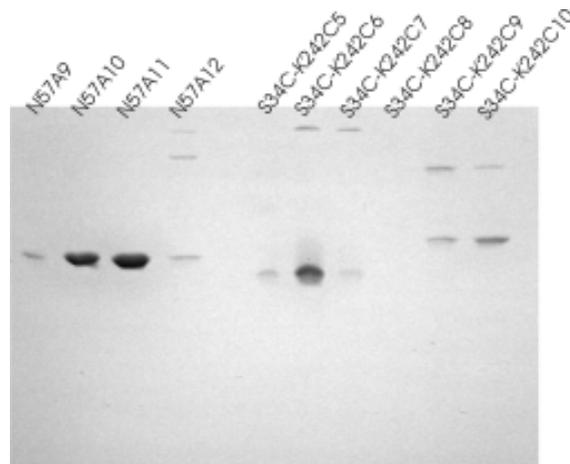
**Figura II.7.:** Salida del registrador en papel continuo al eluir una columna Sep-Pak en la segunda cromatografía.

El registro que se muestra en la figura II.7 es la típica de salida obtenida de una cromatografía en una columna Sep-Pak Accell Plus CM usando un gradifrac de farmacia. En ella podemos observar uno o varios prepicos, y el pico principal de la  $\beta$ -glucanasa. Se desconoce el motivo por el cual se produce este prepico. Las pruebas cinéticas realizadas por anteriores miembros del grupo no han mostrado grandes diferencias entre los dos picos de glucanasa.

En la primera fracción se puede perder parte de la proteína debido a las subidas y bajadas bruscas de flujo, que a veces se producen en el cromatógrafo, cuando cambiamos una columna por otra, o al entrar burbujas de aire en el circuito. En la imagen se aprecia el efecto sobre el registro de la cromatografía debido a la entrada de aire en el circuito al cambiar la columna del mutante M58G por la del silvestre (wt).

#### II.G.11.- Control de pureza Segundo SDS-PAGE

Se realiza una electroforesis al 15 % de acrilamida. El objetivo de esta electroforesis es controlar la pureza de la proteína y ha de permitirnos desechar todas aquellas fracciones en las que la  $\beta$ -glucanasa no estén puras.



**Figura II.8.:** Gel SDS-PAGE al 15 % de las fracciones recolectadas de la segunda cromatografía.

En casos como el mutante S34C+K242C recogemos la 5 y 6 aunque esta última no está del todo pura. Tomar la fracción 6 del pico se justifica sólo en casos en los que el mutante es difícil de producir, como sucede en los dobles mutantes a los que añadimos dos cisteínas. En estos casos, excepcionales, se justifica hacer una tercera cromatografía.

La electroforesis ha de servirnos para cerciorarnos que la  $\beta$ -glucanasa está pura y para seleccionar sólo aquellas fracciones que realmente lo estén.

En el mutante N57A tan sólo habríamos de desechar la fracción 12 las otras tres sirven.