"PURIFICACIÓN DE UNA PEROXIDASA RECOMBINANTE DE NABO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD"

Pérez Anaya, D. B.; Regalado González, C.; Rodríguez Cabrera, N. A.
Facultad de Química/Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.

RESUMEN

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxido-reducción de H_2O_2 y una gran variedad de donadores de hidrógeno. Debido a que la peroxidasa es relativamente estable a altas temperaturas y su actividad puede medirse fácilmente con simples reacciones cromogénicas, es empleada como una enzima modelo en el estudio de estructura de proteínas, reacciones y función de enzimas así como varias aplicaciones biotecnológicas (Hiraga et al., 2001). Actualmente el rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la mayor fuente de peroxidasa. Pero existe una fuerte demanda por nuevas fuentes de peroxidasas, una alternativa es el nabo (*Brassica Napus*). Recientemente se identificó y clonó el cDNA que codifica para una peroxidasa de nabo denominada BnPA (Romero-Gómez *et al*., 2008). El objetivo de este trabajo consistió en expresar y purificar la peroxidasa recombinante BnPA mediante un sistema de dos pasos: por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) y filtración en gel.

INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxido-reducción de H_2O_2 y una gran variedad de donadores de hidrógeno. Se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos las cuales están divididas en tres superfamilias basadas en su estructura y propiedades catalíticas (Welinder 1992). Las peroxidasas de plantas clase III (E.C. 1.11.1.7), son glicoproteínas que contienen el grupo prostético hemo, un complejo formado entre un ión de hierro y una molécula de protoporfirina IX. En plantas participan en la biosíntesis de la pared celular por la polimerización del alcohol cinamílico a lignina y el entrecruzamiento de proteínas estructurales (Hiraga et al., 2001) y en el mecanismo de defensa por daño físico o tejidos infectados (Biles y Martin, 1993) además de otros procesos. Debido a que la peroxidasa es relativamente estable a altas temperaturas y su actividad puede medirse fácilmente con simples reacciones cromogénicas, es empleada como una enzima modelo en el estudio de estructura de proteínas, reacciones y función de enzimas así como varias aplicaciones biotecnológicas (Hiraga et al., 2001). Actualmente el rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la mayor fuente de peroxidasa, la isoenzima C del rábano picante (HRP-C) es la isoenzima más abundante y se usa ampliamente como reactivo en síntesis orgánica, diagnóstico clínico, inmunoensayos enzimáticos y en destoxificación de compuestos fenólicos de aguas residuales (Veitch, 2004). Sin embrago existe una fuerte demanda por nuevas peroxidasas más estables o específicas para aplicaciones particulares.Una buena alternativa como fuente de peroxidasas es el nabo (*Brassica Napus*) debido a que algunas isoformas son capaces de polimerizar compuestos fenólicos de aguas residuales con alta eficiencia (Quintanilla et al., 2008) o pueden ser usadas en pruebas de diagnóstico (Agostini *et al*., 2002), además de tratarse de un vegetal disponible en la región. En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), recientemente se identificó y clonó el cDNA que codifica para una peroxidasa de nabo denominada BnPA (Romero-Gómez *et al*., 2008).

El objetivo de este trabajo consistió en expresar y purificar la peroxidasa recombinante BnPA mediante un sistema de dos pasos: por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) y filtración en gel.

MATERIALES Y METÓDOS

Inducción de la peroxidasa recombinante BnPA en la cepa Rosetta 2 (DE3)

Se inoculó un tubo con 3 ml de medio LB con 30 µl de un stock a –70°C de la cepa Rosetta 2 (DE3) transformada con el vector pET28-BnPA. Se le agregó a cada tubo 30 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml de cloranfenicol y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Se inoculó un matraz de 500 ml conteniendo 200 ml de medio LB con el tubo con crecimiento bacteriano crecido toda la noche y se dejaron en incubación a 37°C y agitación a 200 rpm hasta que alcanzaron una absorbancia a 600 nm de 0.5. Se les agregó IPTG una concentración final de 500 µM y se incubó 37°C durante 4 h más. Las células se cosecharon mediante centrifugaron a 4000 *g* durante 15 min y se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de lisis (5 ml de amortiguador de lisis por gramo de pastilla celular húmeda) el cual contenía Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 2 M y DTT 10 mM). La pastilla resuspendida se sonicó durante un total de 10 min, se dejó reposar en hielo por 30 min y se sonicó nuevamente. El lisado celular se centrifugó a 10000 *g* durante 25 min y se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pastilla). Se tomó una muestra de ambas fracciones y se prepararon para analizarse por electroforesis.

Purificación de la peroxidasa recombinante BnPA mediante cromatografía de afinidad a níquel.

La fracción insoluble o cuerpos de inclusión se resuspendió en 20 ml de amortiguador de solubilización de cuerpos de inclusión (urea 8M, DTT 1 mM). Se dejó en agitación suave durante 1 h y se centrifugó a 10000 *g* durante 25 min. Se separó la proteína solubilizada (sobrenadante, PSU) de la no solubilizada (pastilla, CINS) y se prepararon para analizarse por electroforesis. La proteína solubilizada se pasó por una columna pre-empacada con 1 ml de resina de afinidad a níquel (GE Healthcare), previamente equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador de unión (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 7.4). Una vez que se pasó la muestra, la columna se lavó con 15 volúmenes de amortiguador de unión. La proteína se eluyó con 5 volúmenes de amortiguador de elusión (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4). Se recolectaron fracciones de 500 µl y se les determinó proteína total por el método de Bradford, utilizando seroalbúmina bovina como estándar. Con el objetivo de eliminar la urea, se utilizó una columna de filtración en gel empacada con Bio-Gel®P-6DG (BioRad). Se añadieron 20 ml de amortiguador (2 M de urea y 50 mM Tris-HCl, pH 8) permitiendo que fluyera de la columna. Se añadieron 3 ml de muestra y se dejó que fluyera de la columna. A continuación, se agregaron 4 ml del amortiguador y se recolectaron las fracciones de 1 ml.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el gel de electroforesis de la expresión y purificación de la proteína por afinidad a níquel. En el gel, se observa una banda de la proteína solubizada con urea (PSU) (carril 1). En los lavados de la columna con amortiguador de unión se observa la eliminación de otras

proteínas contaminantes no siendo así con la proteína de interés (carril 2). La proteína eluye principalmente en 3 fracciones (carriles 3-8). La figura 2 muestra que la proteína comienza a eluir a partir del carril 3 concordando con el gel de electroforesis de IMAC.

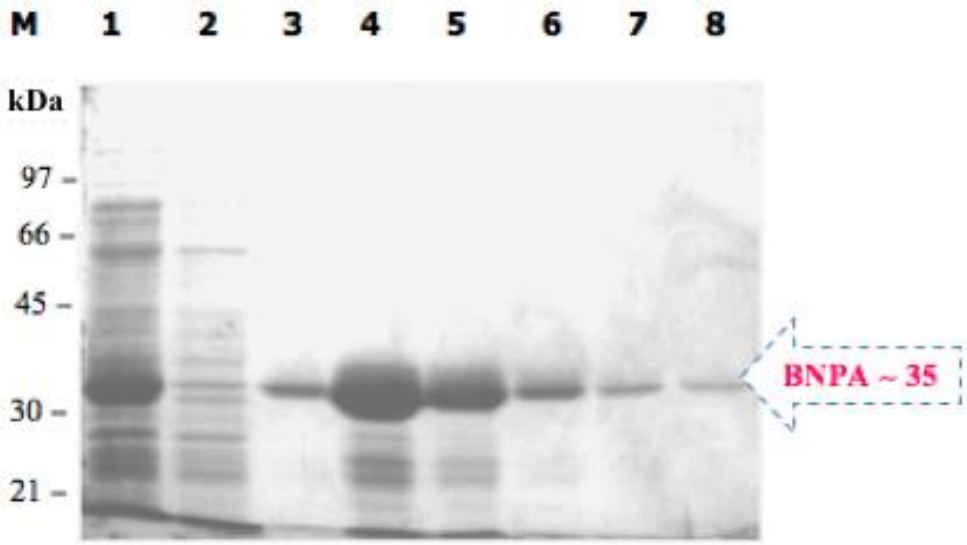

Figura 1. Purificación de la proteína BnPA por IMAC. **Carril M**: Marcador de bajo peso molecular. **Carril 1**) PSU, **carril 2**) lavado de columna, **carriles 3-8**) fracciones eluidas de la columna IMAC.

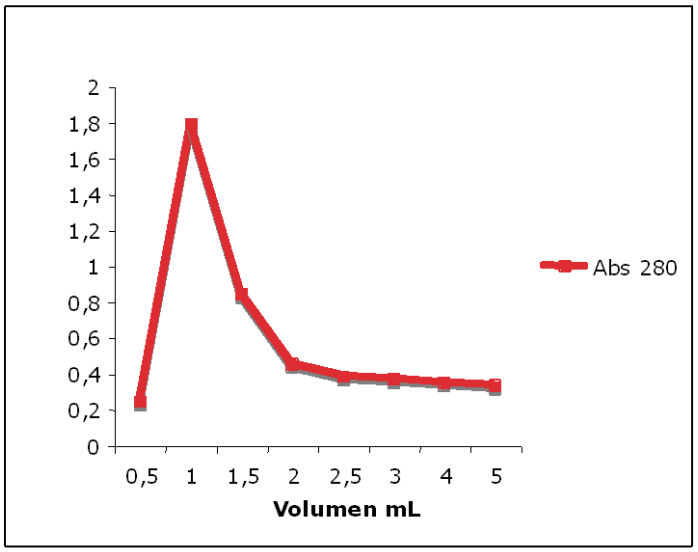

Figura 2. Gráfico de la Absorbancia a 280nm versus el volumen de elusión de las fracciones obtenidas de IMAC.

A fin de eliminar la urea y algunos cotaminantes primordiales, se utilizó una columna de filtración en gel, La figura 3 se muestra un gel de electroforesis del desalado de la proteína BnPA por filtración en gel. En el gel se observa que la proteína comienza a eluir a partir del carril 3, también se puede observar que la proteína contiene una menor cantidad de impurezas. La figura 3 muestra que la mayor cantidad de proteína se obtiene en las fracciones 3 y 4 donde se observa la formación de un pico.

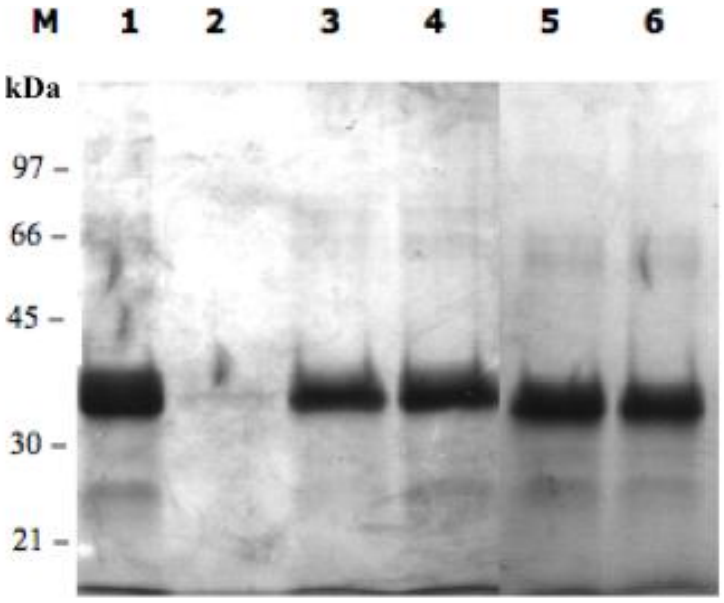

Figura 3. Desalado de la proteína BnPA por filtración en gel. **Carril 1**) proteína eluida de IMAC, **carril 2-6**) fracciones recolectadas de la columna de filtración en gel.

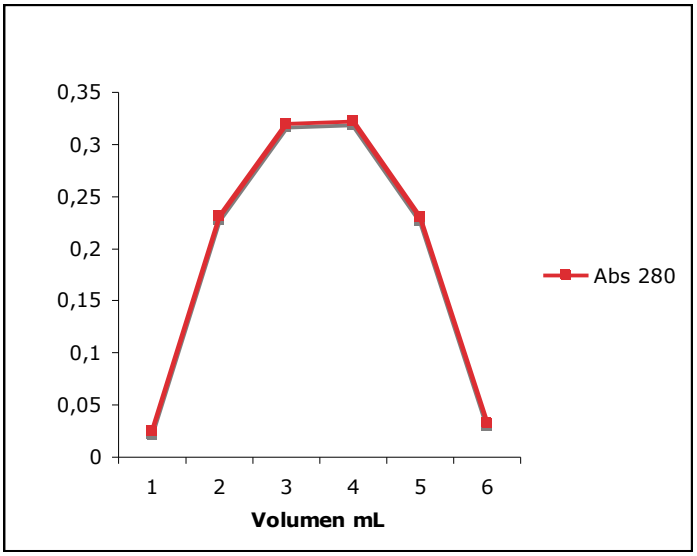

Figura 4. Absorbancia a 280nm versus el volumen de elusión de desalado por filtración en gel.

CONCLUSIONES

Se purificó exitosamente la proteína recombinante BnPA obteniéndose una pureza de aproximadamente 80% en la cromatografía a afinidad a níquel y 90% en la filtración en gel. No fue necesario otro método para lograr una mayor purificación puesto que es posible que se pierda proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini E, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M "A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus)* hairy-root cultures:inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits". Biotechnol Appl Biochem. 35,1-7, 2002

Biles CL and Martin RD "Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings". Plant Physiol. Biochem. 31: 499–506, 1993

Bradford MM "A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal". Biochem. 72, 248-254,1976

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H "A large family of class III plant peroxidases". Plant Cell Physiol. 42,462-468, 2001

Quintanilla-Guerrero F, Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Regalado C "Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase". Bioresource Technol. 99, 8605-8611, 2008

Romero-Gómez S, Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Mayorga Martínez L, Cervantes-Avilés O, Regalado C "A novel putative peroxidase cDNA from turnip and analysis of the encoded protein sequence". Plant Foods Human Nutrition. 63, 157-162, 2008

Veitch N.C. "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme". *Phytochemistry.* 65, 249-259, 2004

Welinder KG "Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases". Curr Opin Struct Biol. 2,388-393, 1992.