

Obtención de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* en un laboratorio de mediana complejidad*

Thermus aquaticus polymerase DNA's production in a medium complexity laboratory

► Fernando Pérez¹, María de los Ángeles Baridón¹, Jaime Henen¹, Graciela Venegoni²

-
1. Bioquímico. Sección Virología.
 2. Bioquímico. Jefe de Servicio de Laboratorio.

* Servicio de Laboratorio. Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. R. Rossi. La Plata, calle 37 entre 116 y 117. Provincia de Buenos Aires - Argentina. Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (IBBM) - Argentina

Resumen

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica de diagnóstico molecular muy sensible, capaz de revelar tan sólo una copia de ADN en una mezcla compleja del mismo. El punto central para la difusión de esta metodología fue el descubrimiento de una ADN polimerasa estable al calor aislada de *Thermus aquaticus* (taq ADN pol), lo cual permitió automatizar el proceso de PCR usando un ciclador térmico, sin la necesidad de una adición continua de ADN polimerasa fresca. El objetivo del trabajo fue adaptar un método para la obtención de taq ADN pol en un laboratorio hospitalario de mediana complejidad usando el equipamiento y los medios de cultivo disponibles. Con este método se consiguió producir un extracto crudo de 10.000 unidades de enzima, de fácil purificación, que mostró tener muy buena actividad enzimática por lo cual es posible utilizarla en una amplia variedad de aplicaciones (PCR clásica, PCR anidada, PCR transcriptasa reversa). La actividad enzimática para estos casos fue comparable con la de la taq polimerasa que se adquiere en el mercado.

Palabras clave: *Thermus aquaticus* * ADN polimerasa * reacción en cadena de la polimerasa

Summary

The PCR (Polymerase Chain Reaction) is a technique of molecular diagnosis so sensitive that it is capable of revealing a single copy of the DNA searched for in a complex mixture of DNA. The main point for the diffusion of the methodology was the discovery of an isolated DNA polymerase of the *Thermus aquaticus* stable to heat (taq DNA pol), which has permitted automatizing the process of PCR by using a thermal cycler, without the need of a continuous addition of fresh DNA polymerase. The aim of the work was to adapt a method for the attainment of taq DNA pol in a hospital lab of medium complexity, by using the equipment and means of culture available. With this method, it was possible to produce a raw extract of 10,000 units of enzyme, of easy purification, which proved to have a wide range of applications (classic PCR, nested PCR, reverse transcriptase PCR). The enzymatic activity for these cases was comparable to that of the taq polymerase that is obtained in the market.

Key words: *Thermus aquaticus* *DNA polymerase * polymerase chain reaction

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permite el análisis del ADN y ARN presentes en un bajo número de copias en muestras clínicas.

El fundamento de la reacción es la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos cebadores o *primers* que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia nucleotídica de interés.

El método consiste en tres etapas que se desarrollan a diferentes temperaturas y se repiten entre 25 y 40 veces, según los diferentes protocolos de laboratorio. La primera etapa desnaturaliza el ADN, separando las hebras; la segunda etapa permite, mediante la elección de la temperatura adecuada, la hibridación de los cebadores al ADN (*annealing*), delimitando la zona de interés; luego, en la tercera etapa, la polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN (elongación).

Cada ciclo duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior. La amplificación resulta exponencial (2^n , donde n es el número de ciclos) (1-4).

El punto central para la difusión de esta metodología fue el descubrimiento de una ADN polimerasa estable al calor aislada de *Thermus aquaticus* (taq ADN pol), lo cual permitió automatizar el proceso de PCR usando un ciclador térmico, sin la necesidad de una adición continua de ADN polimerasa fresca.

Concentraciones elevadas producen pérdidas de especificidad originando amplificaciones no deseadas, mientras que bajas concentraciones disminuyen su sensibilidad. En general, se utiliza aproximadamente una unidad cada 25 μ L de mezcla de reacción.

Se describe aquí un método para la obtención de taq ADN pol posible de realizar en un laboratorio hospitalario de mediana complejidad usando el equipamiento y los medios disponibles.

Materiales y Métodos

CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* usada como hospedador del plásmido recombinante productor de la taq polimerasa (5). Esta cepa fue donada al hospital por el Instituto de Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

El plásmido contiene el operón lac, un gen de resistencia a ampicilina y un fragmento de 2500 pb que contiene el gen de la taq ADN polimerasa. La cepa fue cultivada en caldo nutritivo suplementada con 80 μ g/mL de ampicilina para propagar el plásmido y la concentración necesaria de IPTG (isopropil-tio- β -D-galactopiranosido) aproximadamente 0,5 mM, para inducir la producción de la enzima.

Se utilizó un agitador electromagnético (Precylec) a 100 rpm con un buzo de 3 cm de longitud, estufa de cultivo (Faeta) a 37 °C y centrifuga refrigerada (Rolco CR 5700) con tamaño de rotor de 30 cm.

REACTIVOS

Se utilizaron reactivos grado analítico de distintas marcas comerciales.

MEDIOS DE CULTIVO: Caldo nutritivo (Britania) suplementado con ampicilina (Decilina) en una concentración final de 80 μ g/mL.

Agar Muller Hinton (Britania) suplementado con ampicilina.

IPTG (isopropil-tio- β -D-galactopiranosido): (Bio Vectra). Pesar 60 mg de la droga y agregar 5 mL de caldo nutritivo (0,5 mM). Esterilizar por filtración (cantidad necesaria para 1 litro). Es el inductor plasmídico.

PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoruro): (APOLLO Scientific Ltd). Se agrega en el momento de uso pues es inestable en solución acuosa (vida media 16 min). Preparar una solución 100 mM en isopropanol o etanol y almacenar a 4 °C. Es un producto tóxico, actúa como inhibidor de proteasas.

LISOZIMA: (Sigma) concentración final de 4 mg/mL.

BUFFER A: -dextrosa (Mallinckrodt) 50 mM 9,01 g, EDTA (Anebra) 1mM 0,372 g, Tris (Fluka) 50 mM 6,055 g, agua destilada estéril csp. 1000 mL. Llevar a pH 7,9 con NaOH (Mallinckrodt) 5 N (4).

BUFFER B: Tris 10 mM 0,242 g, ClK (Anal Quim) 50 mM 0,74 g, EDTA 1 mM 0,074 g.

Tween 20 (JT Baker Chemical) 0,5% 1 mL, NONI-DET-P40 (Roche) 0,5% 1 mL, agua destilada csp. 200 mL, llevar a pH 7,9 con NaOH 5 N.

Almacenar en oscuridad a 4 °C. El PMSF, concentración final 100 mM, se debe agregar en el momento de usar (5).

BUFFER DE ALMACENAMIENTO: Glicerol (Mallinckrodt) 65%v/v 65 mL, SO4Mg (Mallinckrodt) 0,1 M 2,46 g, Tris 0,025 M 0,3 g.

Agua destilada estéril csp. 100 mL, llevar a pH 8,0.

PROTOCOLO DE TRABAJO

Día 1:

Sacar la cepa del *freezer* y colocarla 30 minutos en estufa a 37 °C. Trasvasar la cepa del medio anterior a un erlenmeyer de 100 mL que contenga 5 mL de caldo nutritivo con 2 μ L de ampicilina (80 μ g/mL). Dejar en estufa a 37 °C sin agitación 12 h (cultivo toda la noche).

Día 2:

Sembrar 200 μ L del cultivo anterior en un erlenmeyer de 2 litros que contenga 200 mL de caldo nutritivo con 80 μ L de ampicilina (80 μ g/mL). Plaquear el cultivo en un agar Muller Hinton suplementado con ampicilina. Verificar la existencia del plásmido y la pureza de la cepa.

Se lleva a estufa a 37 °C. Guardar el resto del cultivo con *buffer* de almacenamiento fraccionado en Eppendorf en *freezer* a -70 °C. Agregar 100 µL de IPTG (0,5 mM) al erlenmeyer de 2 litros y dejar en estufa a 37 °C con agitación a 100 rpm con buzo durante 16 - 18 h para la inducción de la enzima.

Día 3:

Verificar la pureza de la cepa y la resistencia a ampicilina en el agar Muller Hinton. Trasvasar los 200 mL de caldo nutritivo a un recipiente plástico previamente tratado con alcohol 70 ° y enjuagado con agua destilada estéril. Centrifugar a 2.200 rpm durante 30 min a 10 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 40 mL de *buffer* A. Centrifugar a 2.200 rpm durante 30 min a 10 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 8 mL de *buffer* A que contiene 32 mg de lizosima (concentración final de 4 mg/mL). Dejar reposar 15 min a temperatura ambiente y agregar 8 mL de *buffer* B. (el *buffer* B contiene una concentración final de un inhibidor de proteasas PMSF 1mM. Incubar a 75 °C en baño de agua durante 1 h y centrifugar durante 30 min a 2.200 rpm a 4 °C. Guardar el sobrenadante que contiene la taq polimerasa (aproximadamente 15 mL) en tubo plástico estéril en heladera a 4 °C.

PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA

Dejar el sobrenadante una semana en la heladera a 4 °C para que sedimenten los detritos celulares. Se obtiene así un sobrenadante límpido (extracto crudo) que se fracciona en Eppendorfs de 300 µL y se almacena en heladera a 4 °C. No guardar en *freezer*.

ENSAYO DE ACTIVIDAD

La actividad de la proteína fue medida mediante una PCR clásica y una PCR *nested*. Se utilizó 1 µL de extracto crudo de la taq polimerasa cada 25 µL de mezcla de reacción.

Concentraciones finales de PCR: NTP (Stratagene): 0,4 mM, *Primers* (Operon) :1 µM, *Buffer* 1 x, Cl₂Mg :1,5 mM, Taq :1 µL, H₂O csp :25 µL

Muestra problema ADN : 1 µL

CONDICIONES DE CICLADO: (6) Paso previo de desnaturalización a 94 °C, 2 min. Desnaturalización: 94 °C, 15 seg. *Annealing* 55 °C, 15 s. Extensión: 72 °C 30 s. Se realizaron 30 ciclos. Paso de extensión final: 72 °C 2 min.

Los ensayos de actividad se realizaron en las instalaciones del IBBM de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP con un ciclador Biometra UNO termoblock.

Resultados

Se obtuvieron aproximadamente 10.000 unidades de una proteína cuya actividad fue medida mediante una

PCR clásica y una PCR *nested*. Se utilizó 1 µL de extracto crudo de la taq polimerasa por cada 25 µL de mezcla de reacción.

Discusión

Con la presente técnica se logró adaptar un método de obtención de enzima, que hasta el presente sólo se realizaba en laboratorios de investigación.

El medio de cultivo usado, en vez de ser LB según la técnica original (8), fue caldo nutritivo, disponible en cualquier laboratorio de bacteriología.

Al no contar con un agitador mecánico con control de temperatura, se utilizó un agitador común con un buzo de 3 cm y se colocó el agitador dentro de la estufa de cultivo.

En todas las etapas de cultivo en la estufa se usó una relación superficie /volumen elevada para que hubiese una buena aireación.

En el método original las centrifugaciones se realizan a 8.000 rpm durante 15 min en una centrífuga Sorvall rotor GSA. En este caso se centrifugó a 2.200 rpm durante 30 min en una centrífuga de mayor tamaño de rotor.

Como baño a 75 °C se usó un baño eléctrico seco donde se inactivaron las proteasas y las ADNsas. Se usaron alícuotas pequeñas para favorecer el intercambio de calor.

El trabajo original describe una precipitación con polietilimina del extracto crudo, que remueve la mayoría de los contaminantes, seguida de una cromatografía en columna de intercambio iónico BioRex 70, que elimina aún más proteína extraña (4).

En este caso se hizo una purificación por decantación de los detritos celulares en la heladera a 4 °C por diez días, obteniendo un sobrenadante límpido con buena actividad enzimática (aproximadamente 1 unidad/µL). El extracto obtenido es estable por 6 meses a 4 °C. No debe ser guardado en *freezer*.

Conclusiones

Con este método, laborioso pero accesible a un laboratorio de un hospital público, se consiguió producir un extracto crudo de 10.000 unidades de enzima, de fácil purificación, que ha mostrado tener muy buena actividad enzimática por lo cual es posible utilizarlo en una amplia variedad de aplicaciones (PCR clásica, PCR *nested*, PCR transcriptasa reversa). La actividad enzimática para estos casos es comparable con la de la taq polimerasa que se adquiere en el mercado. Sin embargo, es necesario enfatizar que para otros usos, como PCR *fingerprints*, PCR en tiempo real (7) o en el caso de

buscar genes de *Escherichia coli*, no puede ser utilizada esta taq polimerasa, pues serían necesarios más pasos de purificación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Prof. Dr. Antonio Lagares del Laboratorio IBBM de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por la colaboración prestada y la donación de la cepa de *E. coli* transformada.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES BARIDÓN
Calle 10 N° 3910 entre 495 y 496
1900 Gonnet. LA PLATA. Argentina
E-mail: fernandoaperez@speedy.com.ar

Referencias bibliográficas

1. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR: A Practical Approach. New York: Oxford University Press; 1993.
2. Timothy C, Sinclair J. Biología Molecular en Medicina. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998.
3. Persing D, Smith TF, Tenover, FC, White TJ. Diagnostic Molecular Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993.
4. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons; 1992. pp 1-8.
5. Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Grinsburg D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. Ann Bioch 1990; 191: 396-8.
6. Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM, Taylor JD, Swweenie CH, Smith M, *et al.* Detection of Herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's Disease using nested polymerase chain reaction. J Med Vir 1992; 38: 183-8.
7. Neumann F, Herold C, Hildebrandt G. Quantitative real time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. Eur J Haematol 2003; 70: 1-10.

Acceptado para su publicación el 29 de septiembre de 2006

