

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DNA
POLIMERASA DE *Thermus aquaticus* A PARTIR DE
UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Escherichia coli*.

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA

JORGE GUILLERMO GOMEZ GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS

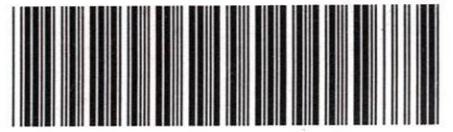
DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

CO-DIRECTOR

M.C. JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DEL 2000

TL
RB43
.8
.D63
G6
c.1

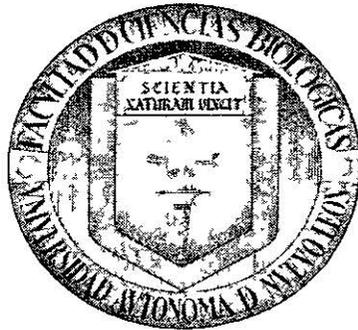


1080094990

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



**PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DNA POLIMERASA DE
Thermus aquaticus A PARTIR DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE
Escherichia coli.**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO**

PRESENTA

JORGE GUILLERMO GOMEZ GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

CO-DIRECTOR

M.C JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L

DICIEMBRE DEL 2000

IT
R B 43
.00
.D 63
C



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA**

**PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DNA POLIMERASA DE
Thermus aquaticus A PARTIR DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE
Escherichia coli.**

**TESIS
QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO**

**PRESENTA
JORGE GUILLERMO GOMEZ GUTIERREZ**

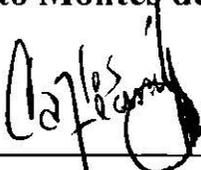
COMISION DE TESIS

Director



Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Secretario



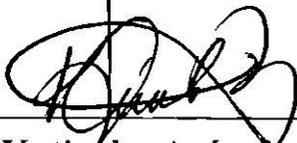
Dr. Carlos Hernández Luna

Vocal



M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez

Suplente



Dra. Katiuska Arévalo Niño

DEDICATORIA

A mis Padres:

Profra. Lourdes Gutiérrez Moreno y C.P Juan José Antonio Gómez Hernández por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera universitaria tan hermosa como es la Biología, además por transmitirme la filosofía del materialismo existencialista y el libre pensamiento así como el camino de la Ciencia.

A mis Hermanas:

L.R.I Corina Gómez Gutiérrez y Psicóloga Elizabeth Gómez Gutiérrez por su apoyo, cariño y comprensión.

A mi Tio:

Prof. Jose Cruz Moreno Herrera por que siempre he contado con su apoyo y consejos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por la gran enseñanza que me dio, por la excelente dirección en esta tesis, por su invaluable amistad y por la confianza que deposito en mi para realizar la presente Tesis.

Al M.C Juan Manuel Adame Rodríguez por el apoyo que me brindo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Hernández Luna y a la Dra. Katiuska Arévalo Niño por su sabios consejos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra por la oportunidad que me dieron de formar parte de su equipo de investigación.

Al Biol. Luis Gilberto Bermúdez Humarán por el extraordinario entrenamiento que me dio para poder llevar acabo este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Biol. David Ruiz Trejo, Biol. Julián López Reyes, M.C Gilberto Jaramillo Rangel, Q.B.P Naima Cortes Perez, Biol.

Abraham Castro Perez, Q.B.P Areli Herrera Díaz, Biol. Pablo Chávez

Zamarripa, Biol. Arnulfo Villanueva Olivo, Biol. Aracely García García, Biol.

Deyanira Quistián Martínez, M.C Analí Gámez Escobedo.

A mis amigos y compañeros de la carrera que siempre supieron corresponder con mi amistad: Fernando Arcivar y David A. Marroquín.

A todos los que contribuyeron de una manera u otra para la realización del presente Trabajo.

GRACIAS

| INDICE | PAGINAS |
|---|----------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | IV |
| AREA DE TRABAJO | VI |
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| I. ANTECEDENTES | 4 |
| 1. Ejemplos de Usos y Aplicaciones del PCR en Biología Molecular. | 5 |
| 2. Uso del PCR en la detección de genes y rearrreglos cromosómicos. | 6 |
| 3. Uso del PCR en la detección de especies bacterianas y virales. | 7 |
| 4. Uso del PCR en estudios filogenéticos. | 7 |
| 5. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 8 |
| II. HIPÓTESIS | 9 |
| III. OBJETIVO | 9 |
| IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 10 |
| V. DIAGRAMA DE FLUJO | 11 |
| VI. MATERIAL Y EQUIPO | 12 |
| 1. Material Biológico. | 12 |
| 2. Equipo de laboratorio. | 12 |
| VII. METODOLOGÍA | 13 |
| 1. Determinación del tiempo óptimo de producción de Taq DNA polimerasa en la cepa recombinante de <i>E. coli</i> . | 13 |
| A). Determinación del tiempo óptimo de sonicación para la obtención de extractos con la mayor actividad de Taq DNA polimerasa. | 13 |

| | |
|---|----|
| B). Determinación del tiempo óptimo de producción de la enzima Taq DNA polimerasa. | 15 |
| 2. Determinación de la producción de Taq DNA polimerasa en los medios LB y TB. | 15 |
| 3. Purificación de Taq DNA polimerasa | 17 |
| 4. Aislamiento de DNA Genómico. | 19 |
| 5. Determinación de la actividad biológica de la Taq DNA polimerasa. | 19 |
| A) Amplificación del Transgen p53 humano a partir del genoma murino. | 20 |
| 6. Preparación del gel de agarosa. | 21 |
| 7. Análisis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS) | 21 |
| 8. Diálisis de la Taq DNA polimerasa con dos tipos de buffer de almacenamiento. | 22 |
| VIII. RESULTADOS | 23 |
| 1. Determinación el tiempo óptimo de sonicación. | 23 |
| 2. Determinación del tiempo óptimo de inducción de Taq DNA polimerasa. | 24 |
| 3. Determinar si la producción de Taq DNA polimerasa es mayor en medio de cultivo LB o TB. | 25 |
| 4. Purificación de Taq DNA polimerasa. | 27 |
| 5. Determinación de la actividad biológica de la Taq DNA polimerasa. | 31 |
| 6. Comparación de la actividad de la Taq DNA polimerasa purificada vs una enzima comercial. | 32 |
| 7. Estabilidad de la Taq DNA polimerasa en dos tipos de buffers de almacenamiento. | 35 |
| IX. DISCUSIONES | 37 |
| X. CONCLUSIONES | 39 |
| XI. LITERATURA CONSULTADA | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|---------------|
| Cloruro de sodio | NaCl |
| Trizma base | Tris |
| Ampicilina | Amp |
| Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido | IPTG |
| Cloruro de potasio | KCl |
| Ácido etilendiaminotetra acético | EDTA |
| Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo | PMSF |
| Polioxietilenesorbitan-monolaurato | Tween |
| Ditiotreitol | DTT |
| (Octilfenoxi)polietoxietanol | IGEPAL |
| N-[2-Hidroxietil]piperasina-N'-[2-ácido etanosulfónico | HEPES |
| Microlitro | μ l |
| Grados centígrados | $^{\circ}$ C |
| <i>Thermus aquaticus</i> | Taq |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E.coli</i> |
| Ácido desoxiribonucleico | DNA |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa | PCR |
| Ácido Ribonucleico | RNA |
| Desoxiribonucleótidos Trifosfato | dNTP's |

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| Pares de Bases | pb |
| Kilodaltones | Kd |
| miligramos | mg |
| milimolar | mM |
| mililitro | ml |
| Hidróxido de Sodio | NaOH |
| Dodecil Sulfato de Sodio | SDS |
| Acetato de potasio | KOOC ₂ H ₃ |
| Molar | M |
| Acido acético | CH ₃ COOH |
| Porcentaje | % |
| Caldo Luria | LB |
| Tris-EDTA | TE |
| Dietilaminoetil Celulosa | DE52 |
| Potencial de iones Hidrogeno | pH |
| Revoluciones por minuto | rpm |
| Nanómetros | nm |
| Transgen | Tg |
| Caldo altamente nutritivo | TB |
| Extracto Crudo | EC |

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| Adenina | A |
| Timina | T |
| Guanina | G |
| Citocina | C |
| 1X | una concentración |
| Transiluminador | TI |
| Bromuro de etidio | BE |
| Rayos Ultra Violeta | UV |
| Triton, SDS, NaCl, Tris-HCl | TSNT |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | PAGINA |
|---|--------|
| 1. Monitoreo del tiempo óptimo para la lisis celular así como de la estabilidad de la Taq DNA polimerasa | 24 |
| 2. Determinación del tiempo óptimo de la producción de la Taq DNA polimerasa. | 25 |
| 3. Actividad de Taq DNA polimerasa obtenida de dos medios diferentes: LB y TB. | 26 |
| 4. Determinación de la productividad de Taq DNA polimerasa en dos medios de cultivo: LB y TB. | 27 |
| 5. Determinación de actividad de Taq DNA polimerasa en las fracciones eluidas de la columna de DE52. | 28 |
| 6. Detección de Taq DNA polimerasa en las fracciones eluidas de la columna de Bio-Rex 70. | 29 |
| 7. Análisis de la enzima purificada Taq DNA polimerasa por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. | 31 |
| 8. Amplificación del gen <i>CHD</i> de aves usando la Taq DNA polimerasa purificada. | 32 |
| 9. Amplificación del gen p53 heterocigoto a partir del genoma murino | 33 |
| 10. PCR múltiple del brazo largo del cromosoma Y humano, usando la Taq DNA polimerasa purificada | 34 |
| 11. Amplificación tipo “Nested-PCR” de un Fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110 del complejo <i>M. Tuberculosis</i> . | 35 |

12. Monitoreo de la Taq DNA polimerasa con respecto a su actividad

a través del tiempo en dos tipos de Buffers de almacenamiento (BI y BII)

36

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y M.C Juan Manuel Adame Rodríguez.

RESUMEN

En el presente trabajo se implementó un método para la producción y purificación de la enzima Taq DNA polimerasa a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli*. Se determinó el tiempo de mayor producción en cultivo, se probaron dos diferentes medios para el crecimiento de dicha bacteria y dos diferentes buffers de almacenamiento para la enzima purificada. A partir de un litro de cultivo se logró obtener enzima Taq DNA polimerasa equivalente a 100,000 unidades. Esta enzima purificada se ha utilizado en protocolos estándar de laboratorio para la amplificación de secuencias genómicas de bacterias, virus, aves, ratones, bovinos y humanos, mostrando ser igual o mas eficiente que una preparación comercial. La actividad de la enzima purificada ha permanecido estable durante nueve meses de almacenamiento a -20°C .

INTRODUCCIÓN

La biología molecular ha tenido un gran auge en las últimas cuatro décadas desde el descubrimiento de la molécula de la herencia (DNA) hasta los ahora innovadores métodos de clonación y secuenciación de genes. Todo esto ha llevado a formar una gran tecnología la cual ha sido muy útil para la humanidad. La Biología Molecular encuentra amplios usos en la medicina, industria, agricultura, etc. Por ejemplo la expresión de genes en organismos extraños permite la elaboración de importantes proteínas como la insulina y la hormona del crecimiento. En la agricultura, a las plantas se les puede conferir resistencia al ataque de insectos. En medicina, se ha implementado el diagnóstico molecular de enfermedades, el aislamiento de genes, la amplificación de un segmento específico de DNA humano y de otros organismos etc. Las técnicas con las que se han obtenido todos estos avances son, entre algunos ejemplos: a) la ruptura específica del DNA mediante enzimas de restricción que facilita enormemente el aislamiento y la manipulación de los genes individuales; b) la secuenciación rápida de todos los nucleótidos de un fragmento purificado de DNA que hace posible determinar los límites precisos de un gen y de la secuencia de aminoácidos que codifica; c) la hibridación de ácidos nucleicos que hace posible localizar secuencias determinadas de DNA ó RNA con una gran exactitud y sensibilidad utilizando la capacidad que tienen

estas moléculas de unirse a secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos; d) la clonación, mediante la cual se puede conseguir que un fragmento de DNA se integre en un vehículo molecular y se replique millones de veces, y por último e) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El PCR es un extraordinario método para la síntesis de DNA *in vitro*. Este puede amplificar un fragmento específico de DNA o un gen completo en varios millones de veces en pocas horas, lo que lo hace un método con enormes aplicaciones que ha ocasionado una revolución en la tecnología de la Biología Molecular. Tiene importantes usos en el diagnóstico médico, ya que se puede utilizar en la detección de mutaciones, en el diagnóstico y monitoreo de la terapia usada en el cáncer, en la detección de infecciones vírales y bacterianas, en la determinación del sexo en células prenatales, en los estudios de evolución molecular, en la clonación de genes, etc.

Originalmente el procedimiento del PCR se estableció usando la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (1), sin embargo, un problema asociado al uso de esta enzima es su inactivación debido a las altas temperaturas que se usan en este ensayo; y por tal motivo tenía que añadirse en cada ciclo de amplificación. Este problema se resolvió con el descubrimiento de una polimerasa termoestable (2), la cual permanecía activa a las temperaturas usadas en la reacción de PCR. Esta enzima es la Taq DNA polimerasa producida por la

bacteria *Thermus aquaticus* (2). La Taq DNA polimerasa simplificó en gran medida la reacción de PCR al prescindir de la adición de la misma después de cada ciclo, sin embargo, *T. aquaticus*, requiere de condiciones especiales para su cultivo y muestra bajos niveles de síntesis de esta polimerasa. La producción de esta enzima se facilitó con la clonación del gen que la codifica y su expresión en *E.coli* (3). En el presente trabajo se implementó un procedimiento para la producción y purificación de la enzima Taq DNA polimerasa a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli*.

I. ANTECEDENTES

Kary Mullis, en 1985, reportó por primera vez el procedimiento del PCR, utilizando en aquel entonces la DNA polimerasa I de *E. coli* [1]. En 1988 Randall K. Saiki reportó la amplificación enzimática de un segmento de 167 pares de bases del gen humano de la β -globina usando una DNA polimerasa termoestable. La enzima aislada de *Thermus aquaticus*, simplificó grandemente el procedimiento al evitar la necesidad de adicionar enzima en cada ciclo del procedimiento. Además, por el hecho de funcionar a altas temperaturas, se mejoró significativamente la especificidad, calidad, sensibilidad y alargamiento de fragmentos de DNA. Con ésto se logró amplificar con alta especificidad un gen de copia única a partir de una secuencia genómica, con un factor de más de 10 millones de veces [8].

Frances C. Lawyer, en 1989, reportó el aislamiento, caracterización, y expresión en *E. coli* del gen que codifica para la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*. Con esto se consiguió un rendimiento mayor del 30% de la proteína bacteriana [6]. En 1990 David R. Engelk reportó la purificación de la DNA polimerasa de *T. aquaticus* expresada en *E. coli*. En ese trabajo se describió un método simplificado para la purificación de esta enzima. La purificación involucró un tratamiento con calor, precipitación de la enzima con polietilenamina y purificación a través de una resina de intercambio catiónico. La preparación resultante de la enzima contiene una proteína casi homogénea consistente con el tamaño establecido previamente de la Taq DNA polimerasa y con un rendimiento de 40-50 mg de proteína/ L de cultivo celular [8].

1. Ejemplos de Usos y Aplicaciones del PCR en Biología Molecular.

Randall K. Saiki, en 1985, reportó la amplificación enzimática de la secuencia genómica de β -globina y su análisis con enzimas de restricción para el diagnóstico de anemia de células falciformes. Ésta fue la primera aplicación del PCR usando la enzima DNA polimerasa I de *E. coli*. [2]. El mismo autor en 1986 reportó una variante de la técnica de ASO (Oligonucleótido Específico del Alelo) usando PCR, con lo cual mejoró la sensibilidad, especificidad y simplicidad de este procedimiento. Originalmente en esta técnica se hacían

híbrida oligonucleótidos directamente con el genoma, pero con la introducción del PCR, primeramente se amplifica la región a analizar y el producto de PCR es el que se híbrida con los oligonucleótidos. De esta manera realizaron el análisis de mutaciones de los genes alfa y beta *HLA-DQ*. Este método de la amplificación *in vitro* incrementa significativamente la detección de mutaciones y permitió el análisis de las variaciones alélicas con tan solo 1 ng de DNA genómico en combinación con una prueba de “dot blot” para la hibridación [3].

2. Uso del PCR en la detección de genes y rearrreglos cromosómicos.

Ming-Sheng Lee, en 1987, reportó mediante PCR la detección de células portadoras de una translocación cromosómica. Por medio de esta técnica se amplificó la región de unión de los cromosomas translocados, característica de los linfomas foliculares t(14;18) (q32;q21). Esta técnica permitió la detección de células que transportan la secuencia híbrida de DNA t(14;18) en una dilución de 1:100,000 [4]. En 1994, utilizando la misma técnica, Ke-hui Cui reportó el sexado de embriones humanos amplificando el gen *ZFY* específico del cromosoma Y [9].

3. Uso del PCR en la detección de especies bacterianas y virales.

Peter Radstrom reportó en 1994 la detección de DNA bacteriano en fluido cerebro espinal mediante un ensayo simultáneo para la detección de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, y *Streptococci*. El ensayo de PCR fue dividido en dos amplificaciones de DNA. En la primera se amplificaron fragmentos de DNA bacteriano en general y en la segunda se amplificó DNA específico de especie. La alta especificidad del ensayo de PCR fue demostrado usando 133 cepas como testigos bacteriales de 28 especies diferentes [10]. En 1996 Herve Lerat reportó la detección específica de la cadena menor de RNA del virus de la hepatitis C en células hematopoyéticas, en combinación con una reacción de transcripción reversa y amplificación (RT-PCR) [11].

4. Uso del PCR en estudios filogenéticos.

En 1989, Thomas R.H reportó la filogénia del extinto lobo marsupial, *Thylacinus cynocephalus*. En este trabajo se utilizó secuenciación directa por medio de PCR para comparar 219 bases de DNA mitocondrial de especímenes de lobo marsupial de museo y representantes de 6 generaciones de marsupiales extintos. Los resultados obtenidos indican que el lobo marsupial es mas cercano a otros marsupiales carnívoros de Australia que a los de Sudamérica [7].

5. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en lo siguiente:

1). el DNA que se quiere amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas.

El DNA de doble cadena se desnaturaliza por calor (a unos 94°C) hasta que se disocia en cadenas sencillas (normalmente en 4 min).

2). Los oligonucleótidos, o primers, que son fragmentos de DNA sintéticos de cadena sencilla, se hibridan a regiones del DNA desnaturalizado que flanquean el segmento que se desea amplificar. Generalmente se utilizan dos oligonucleótidos diferentes. Cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del DNA. Los oligonucleótidos se alinean encarados con sus extremos 3', ya que hibridan a cadenas opuestas. La utilización de oligonucleótidos sintéticos significa que se debe tener alguna información de la secuencia de DNA a amplificar.

3). A la mezcla de la reacción se le añade cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) y una DNA polimerasa termoestable (resistente al calor) (esta polimerasa es la Taq DNA polimerasa). La Taq DNA polimerasa extiende los oligonucleótidos en dirección 5' a 3', utilizando como molde el DNA de cadena sencilla unido al oligonucleótido. El producto es una molécula de DNA de doble cadena con los oligonucleótidos incorporados en el producto final.

Cada grupo de tres pasos (desnaturalización del DNA de doble cadena a 94°C, hibridación de los oligonucleótidos de 55 a 65°C y extensión por la Taq DNA polimerasa a 72°C) se denomina ciclo. Generalmente, cada paso del ciclo se realiza a temperatura diferente. El ciclo se repite llevando a cabo otra vez todos los pasos y después de 35 ciclos se obtienen varios millones de copias del DNA inicial.

II. HIPOTESIS

Es posible obtener la proteína Taq DNA polimerasa activa a partir de una cepa recombinante de *Escherichia.coli*.

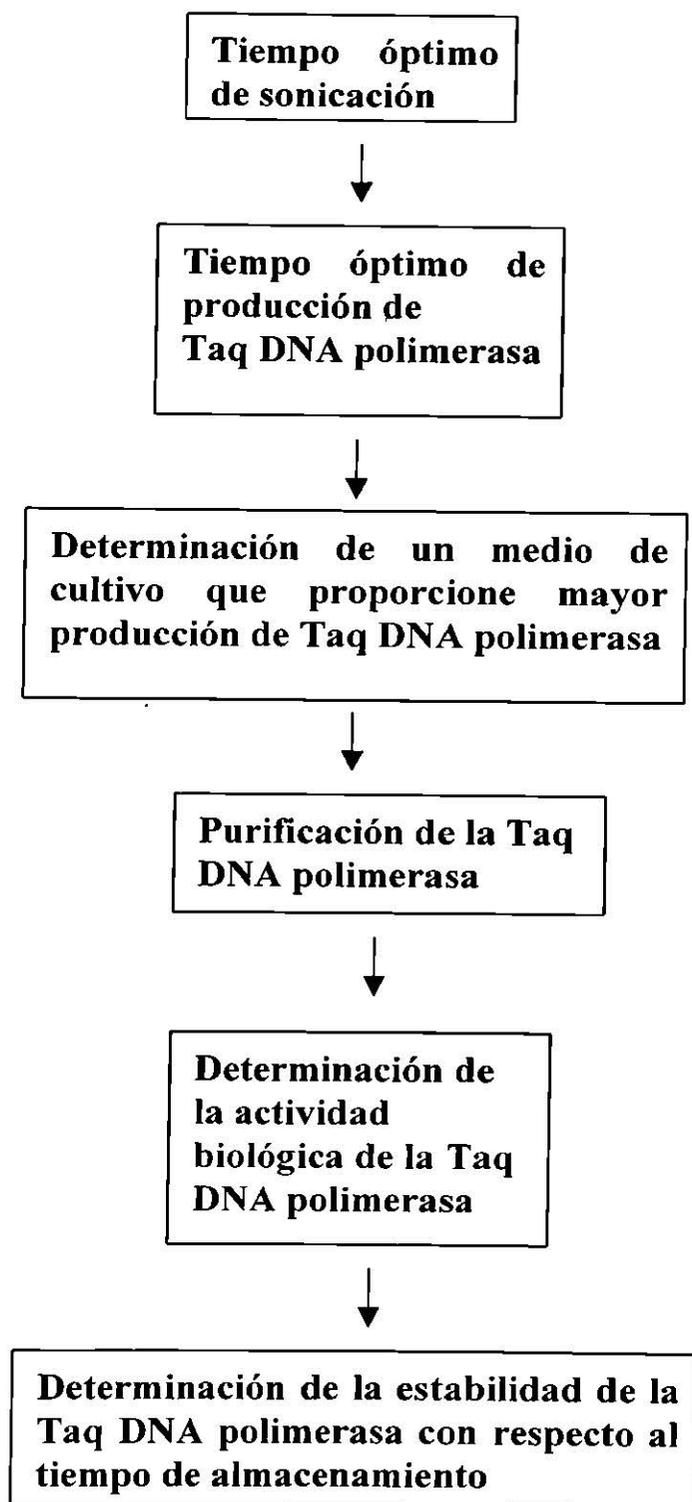
III. OBJETIVO GENERAL

Implementar un procedimiento para la producción y purificación de la enzima DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* a partir de una cepa recombinante de *Escherichia. coli*

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el tiempo óptimo de producción de la enzima Taq DNA polimerasa en la cepa recombinante de *Escherichia coli*.
2. Determinar en cual de los dos medios de cultivo (LB o TB) se presenta mayor producción de Taq DNA polimerasa.
3. Purificar la enzima Taq DNA polimerasa.
4. Determinar la actividad biológica de la enzima Taq DNA polimerasa.
5. Determinar la estabilidad de la Taq DNA polimerasa purificada en dos tipos buffer de almacenamiento.

V. DIAGRAMA DE FLUJO



VI. MATERIAL Y EQUIPO

1. Material Biológico.

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* recombinante DH 5 α que porta el plásmido pTRC-Taq. En dicho plásmido está clonado el gen de la Taq DNA polimerasa.

2. Material y Equipo de laboratorio.

Incubador con agitación Brinkmann Orbimix 1010

Espectrofotómetro Beckman DU 650

Columna de vidrio para cromatografía de líquidos modelo Econo-column de 2.5 cm de diámetro interno, 10 cm de largo empaque con 2 piezas.

Ultracentrífuga Beckman Avanti J-25I.

Ultracentrífuga Beckman con rotor SW 28.

Microcentrífuga Eppendorf 5415C

Tubos de polipropileno de 0.6ml y 1.5 ml

Membrana para diálisis Spectrum Spectra/Por

Transiluminador de Rayos Ultravioleta Fisher Scientific FBTIV-88

Fotodocumentador de geles UVP Epi-Chem-Darkroom

VII. METODOLOGIA.

1. Determinación del tiempo óptimo de producción de Taq DNA polimerasa en la cepa recombinante de *E. coli*.

Para conocer el tiempo óptimo de la producción de la Taq DNA polimerasa, primeramente se probaron tres diferentes procedimientos para la obtención de extractos celulares, y posteriormente se aplicó uno de estos procedimientos para la preparación de dichos extractos celulares a diferentes tiempos de crecimiento bacteriano.

A) Determinación del tiempo óptimo de sonicación para la obtención de extractos con la mayor actividad de Taq DNA polimerasa.

Para la preparación de los extractos celulares y la posterior cuantificación de la Taq DNA polimerasa, se probaron tres procedimientos de lisis: el primero fue con calor, el segundo con lisozima y el tercero con sonicación. Este último fue el que presentó el mejor resultado. El tiempo de sonicación óptimo se determinó en base a la actividad de Taq DNA polimerasa presente en los extractos celulares en función del tiempo de sonicación. Para este experimento se inocularon 25 ml de medio LB/Amp con la bacteria recombinante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.250 a 550 nm. Cuando se alcanzó tal densidad se añadieron 150 μ l del inductor IPTG (20 mg/ml) y se incubó a 37°C

con agitación toda la noche. Se tomaron muestras de 1ml de cultivo para probar los diferentes tiempos de sonicación. Cada muestra se centrifugó por 1 min a 14000 rpm y se decantó el sobrenadante. Después se resuspendieron las células en 200 μ l de Buffer A (Tris, pH 7.9 50 mM, glucosa 50 mM, EDTA 1 mM). La mezcla se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 40 μ l de Buffer A y 40 μ l de Buffer B (Tris, pH 7.9 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Tween 0.5%, IGEPAL 0.5%, 50 mM KCl). Posteriormente, cada muestra se sonicó a diferentes tiempos de 1 a 10 min con 3 pulsos de 20 seg por minuto de sonicación, seguido de un tratamiento con calor a 75°C por 20min y centrifugación a 14000 rpm por 1 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se le determinó la actividad relativa de Taq DNA polimerasa en una reacción de PCR. Esta reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l y se amplificó un transgen p53 humano (Tg p53) a partir de un genoma murino. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el producto del PCR se tiñó con bromuro de etidio (BE) y se observó en un transiluminador (TI) de rayos ultravioleta (RUV).

B) Determinación del tiempo óptimo de producción de la enzima Taq DNA polimerasa.

Para determinar el tiempo óptimo de producción de Taq DNA polimerasa básicamente se hizo lo mismo que en el protocolo anteriormente descrito. Sin embargo, en este protocolo se tomaron muestras de 1ml del cultivo celular cada dos horas durante 16hrs a partir de la inducción con IPTG. Cada muestra se centrifugó a 14000 rpm por 1 min., se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µl de Buffer A. Después se centrifugó por 1 min. a 14000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 40 µl de buffer A y 40 µl de buffer B (50 mM KCl). Cada muestra se sonicó por 6 minutos, con 3 pulsos de 20 seg. por min. (éste fue el tiempo óptimo de sonicación), se incubaron a 75° C por 20 min., se centrifugaron por 1 min. a 14000 rpm, se recuperaron los sobrenadantes y se les determinó la actividad de Taq DNA polimerasa de manera similar a lo descrito en el punto anterior.

2. Determinación de la producción de Taq DNA polimerasa en los medios de cultivo LB y TB.

Para cumplir con este objetivo se realizó lo siguiente. Se preparó un preinoculo de 5 ml en LB/Amp el cual se utilizó para inocular 25 ml de ambos tipos de medio: LB (1% peptona de caseína, 1% de NaCl y 0.5% de extracto de

levadura) y TB (0.3gr de peptona de caseína, 0.6 gr de extracto de levadura, 0.1ml de glicerol). El cultivo se incubó a 37°C con agitación constante hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.250 a 550 nm y se añadió IPTG para inducir la expresión del gen. Se incubó por 14 hrs más y se determinó la actividad de Taq DNA polimerasa de acuerdo con lo descrito anteriormente.

Por un lado se prepararon extractos por sonicación usando 1 ml de cada medio y el resto de ambos medios se procesó como se describe a continuación. Se centrifugó a 4000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de buffer A. Después se centrifugó a 4000 rpm por 15 min y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de Buffer A conteniendo 4 mg/ml de lisozima. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min, se le adicionó 1ml de buffer B (50 mM de KCl) y se incubó por 1 hr a 70°C. Se centrifugó a 4000 rpm por 25 min y se recuperó el sobrenadante, del cual se prepararon diferentes diluciones (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) para la determinación de la actividad de Taq polimerasa por PCR. En dichas reacciones se amplificó el Tg p53 humano a partir de genoma murino y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, usando tinción con bromuro de etidio para observar los productos de PCR con luz UV.

3. Purificación de Taq DNA polimerasa

Para cumplir con el objetivo de purificar la enzima Taq DNA polimerasa se desarrolló el siguiente protocolo, donde se tomó como punto de partida el resultado del experimento del tiempo óptimo de producción de la enzima Taq DNA polimerasa y del medio que proporciona mayor producción de Taq DNA polimerasa.

Día 0: Se inocularon 5 ml LB Amp (40 µg/ml) con una colonia de *E.coli* DH5α portando el plásmido pTRC-Taq. El preinóculo se incubó toda la noche a 37°C con agitación.

Día 1: Se transfirieron 1.25 ml del preinóculo en 4 matraces conteniendo 250 ml LB con 40µg/ml Amp, se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.250 nm (antes de la fase logarítmica). A cada matraz con 250 ml de LB se añadieron 1.5 ml de IPTG a una concentración de 20 mg/ml y se incubaron nuevamente a 37°C con agitación durante 14 hrs.

Día 2: Se midió la densidad óptica de los cultivos y se transfirieron a cuatro botes de centrifugación de 250 ml. Se centrifugó por 15 min a 4000 rpm, se resuspendieron las células de los 4 botes en un total de 200 ml de buffer A y se centrifugó nuevamente por 15 min a 4000 rpm. La pastilla celular se resuspendió en 40 ml de buffer A conteniendo 4 mg/ml de lisozima y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Se le adicionaron 40 ml de buffer B (50

mM KCl) y se incubó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml por 1 hora a 70°C. Posteriormente se centrifugó a 25,000 rpm por 45 min a 4°C en un rotor SW 28. Al sobrenadante obtenido se le ajustó la concentración de KCl a 200 mM, se pasó por una columna de DE52 previamente preparada y equilibrada con buffer B (200 mM KCl) a 4°C.

Se colectaron fracciones de 5 ml y se combinaron aquellas que en ensayos PCR presentaron actividad de Taq DNA polimerasa. La solución se dializó toda la noche a 4°C en tres volúmenes de Buffer C sin KCl (HEPES, pH 7.9 20mM, EDTA 1mM, PMSF 0.5mM, Twwen20 0.5%, IGEPAL 0.5%).

Dia 3: El dializado se pasó por una columna de resina Bio Rex 70 equilibrada con Buffer C (50 mM KCl), la columna se lavó con Buffer C (50 mM KCl) y la Taq DNA polimerasa se eluyó con KCl a 200 mM en Buffer C. Se colectaron fracciones de 1ml y se les determinó actividad de Taq DNA polimerasa mediante un ensayo de PCR. Se mezclaron aquellas fracciones que presentaron actividad DNA polimerasa y la mezcla se dializó en 100 volúmenes de Buffer de almacenamiento (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0.1mM, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM, Glicerol al 50% y H₂O bidestilada estéril).

4. Aislamiento de DNA Genómico.

Para aislar el DNA genómico se tomaron muestras de sangre de diferentes organismos como aves, ratones y humanos. Se colocaron 300 μ l de sangre en un vial de 1.5 ml y se añadieron 200 μ l de buffer lisis TSNT (Triton 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0). Posteriormente se adicionaron 500 μ l de Fenol y se mezcló por vortex. Después se añadieron 100 μ l de SAVAGE (Cloroformo: Alcohol Isoamilico 24:1), 200 μ l de buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.0) y se mezcló con vortex. Se centrifugó la muestra por 15 min a 14000 rpm y se transfirió la capa acuosa a un tubo nuevo para precipitar el DNA con dos volúmenes de Isopropanol al 100%. La solución se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ l de buffer TE 1X.

5. Determinación de la actividad biológica de la Taq DNA polimerasa.

Para determinar la actividad de la Taq DNA polimerasa se realizaron ensayos de PCR en un volumen final de 25 μ l. Se realizaron principalmente dos tipos de amplificaciones: (1) usando DNA genómico de ratones transgénicos para amplificar un transgen p53 humano y (2) usando DNA genómico de

ratones heterocigotos para el gen p53 endógeno, utilizando oligonucleótidos para amplificar en la misma reacción tanto el alelo silvestre como el mutante.

A) Amplificación del Transgen p53 humano a partir del genoma murino.

Para la amplificación del Tg p53 humano a partir del genoma murino se preparó una mezcla con todos los componentes la cual se describe a continuación: 100 ng del oligonucleótido P3 (ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC), 100 ng del oligonucleótido GE5R (TCCAAATACTCCACACGCAA), 2.5 µl de una mezcla de cada desoxirribonucleótido (ATP,TTP,GTP,CTP) a una concentración de (2.5 mM), 2.5 µl de Buffer de reacción 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl) y 1 µl de DNA murino (200 ng). Esta mezcla es para una reacción (1X) y la cantidad de volumen de cada componente aumenta proporcionalmente cuando se amplifica más de una muestra. Al final se añadió 1 µl de Taq DNA polimerasa purificada por reacción. A la mezcla se le adicionó H₂O bidestilada estéril para completar 25 µl de volumen final. Las condiciones del PCR fueron: 1) un ciclo de 4 min a 94°C, 2) 35 ciclos de 1 min a 94°C seguido de 1 min a 60°C y 3min a 72°C, y 3) 1 ciclo de 7 min a 72°C. Posteriormente se analizaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, dichos productos se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz UV.

Para la amplificación de los otros genes que se muestran en la sección de resultados, se empleó una metodología muy similar a la descrita anteriormente, pero se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes para cada gen y DNA templado proveniente de diferentes organismos.

6. Preparación del gel de agarosa.

Todos los ensayos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa en el cual los fragmentos de DNA se separan de acuerdo a su tamaño. Se usaron geles de agarosa al 0.8 % disolviendo 0.8 gr de agarosa en un volumen final de 100 ml de Buffer TAE 1X (Tris base al 1 M pH 8, EDTA 0.5 M pH 8.0). Al final de la electroforesis el gel se sumerge en una solución con bromuro de etidio el cual se une al DNA y fluoresce con luz ultravioleta.

7. Análisis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Utilizando una solución de acrilamida-bisacrilamida (19:1), se preparó un gel de resolución al 12%. (Tris pH 8.8 0.4 M, 0.1% SDS, 0.1% persulfato de amonio y 0.0004% TEMED) y un gel de empaquetamiento al 5% (Tris pH6.8 0.127M, 0.1% SDS, 0.1% persulfato de amonio y 0.001% TEMED).

Se cargaron de 5-20 μ l de la muestra conteniendo un volumen de buffer de carga (50 mM de Tris- HCl pH 6.8, SDS 2%, 100mM DTT, 0.1% de azul de

bromofenol y 10% de glicerol). La electroforesis se llevó a cabo utilizando buffer de corrida 1X (Tris-HCl pH 8.8 25 mM, glicina 250mM, SDS 0.1 %). Al terminar el corrimiento del gel, éste se tiñó con una solución de azul de Comassie, y se destiñó con una solución fijadora (10% de Ácido Acético, 30% de Metanol y 60% de Agua).

8. Diálisis de la Taq DNA polimerasa en dos tipos de buffer de almacenamiento.

Con el fin de determinar en cual de los dos tipos de buffer de almacenamiento la Taq DNA polimerasa se mantiene estable a través del tiempo, se realizó lo siguiente. En el paso final de la purificación, se mezclaron aquellas fracciones con actividad de Taq DNA polimerasa y se dializaron en 100 volúmenes ya sea de Buffer I (HEPES 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0.1mM, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM, Gliserol al 50% y H₂O bidestilada estéril). ó Buffer II (1 M Tris pH 8, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.5% IGEPAL, 50% Glicerol y H₂O bidestilada estéril) con un cambio a las 12 hrs, con un tiempo total de diálisis de 24 hrs. A la enzima dializada se le determinó la actividad de Taq DNA polimerasa a través del tiempo, a intervalos de dos meses.

VIII. RESULTADOS

Para determinar el tiempo óptimo de inducción de Taq DNA polimerasa por IPTG en la bacteria recombinante, se estableció un protocolo para preparar extractos celulares a partir de 1 ml de cultivo, en los cuales se pudiese detectar la actividad de Taq DNA polimerasa. Como se mencionó en la sección de Metodología, se probaron tres diferentes procedimientos de lisis celular: ebullición, lisozima y sonicación. Para lo anterior muestras de 1 ml de cultivo de la bacteria recombinante, se centrifugaron y diferentes pastillas celulares se sometieron a los tres diferentes tratamientos. Al analizar los extractos celulares encontramos que en aquellos extractos preparados por sonicación fue posible la detección de Taq DNA polimerasa mediante un ensayo de PCR, por lo cual se procedió al establecimiento del tiempo óptimo de sonicación..

1. Determinación del tiempo óptimo de sonicación.

En la *Figura 1* se muestra el resultado de los tiempos de sonicación (1 a 10 minutos), donde encontramos que el mayor porcentaje de actividad se presentó entre los 4 y 6 minutos de sonicación, y que a tiempos mayores de sonicación se afectó la actividad de Taq DNA polimerasa. Este tiempo de sonicación se utilizó en el siguiente experimento de determinar el tiempo óptimo de producción de Taq DNA polimerasa.

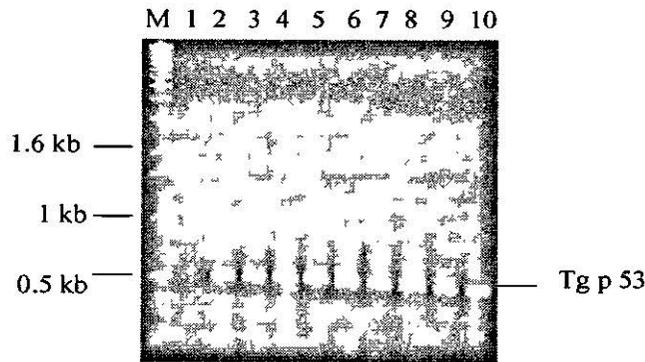


Figura 1. Monitoreo del tiempo óptimo para la lisis celular así como de la estabilidad de la Taq DNA polimerasa. M marcador de peso molecular 1 kb, carriles 1 al 10 corresponden de 1 a 10 minutos de sonicación con tres pulsos de 20 segundos en cada minuto.

2.Determinación del tiempo óptimo de inducción de Taq DNA polimerasa.

Debido a que en la bacteria recombinante el gen de la Taq DNA polimerasa esta bajo la regulación del promotor *lac*, el cual es inducible con IPTG, era necesario definir el mejor tiempo para cosechar las bacterias después de la inducción con IPTG. Los resultados de este experimento se muestran en la *Figura 2*. Después de analizar la actividad de Taq DNA polimerasa obtenida de muestras de cultivo tomadas cada 2 horas a partir de la inducción, nos encontramos que a las 10 horas de inducción (carril 5) se presentó la mayor actividad de Taq DNA polimerasa; a las 2 horas no se logró detectar dicha actividad enzimática (carril 1), y la misma comenzó a detectarse a las 4 horas (carril 2), incrementándose progresivamente hasta las 10 horas de crecimiento bajo inducción (carril 5) y disminuyendo a partir de las 12 horas (carril 6). Estos

resultados indican que el tiempo óptimo de producción de Taq DNA polimerasa se obtiene a las 10 horas de inducción.

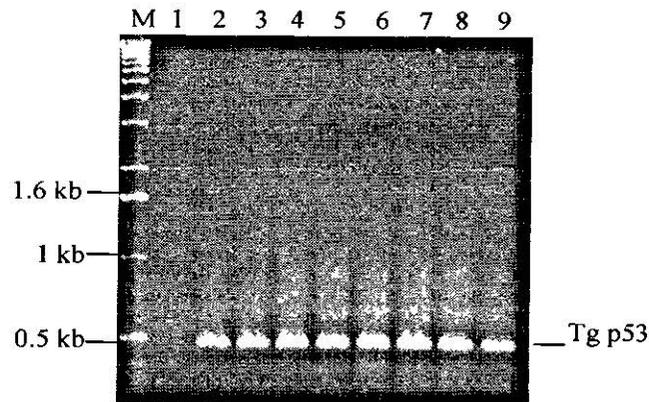


Figura 2. Determinación del tiempo óptimo de la producción de la Taq DNA polimerasa. M es el marcador de peso molecular 1 kb, carriles del 1 al 9 corresponden a cada dos horas después de la inducción para la expresión del gen.

3. Determinar si la producción de Taq DNA polimerasa es mayor en medio de cultivo LB o TB.

El medio TB es un medio mas enriquecido y se alcanzan densidades celulares de bacterias mayores que las que se obtienen con LB. Por tal motivo decidimos probar si en el medio TB se obtenía un rendimiento más elevado de Taq DNA polimerasa. La bacteria recombinante se creció en los dos medios, se indujo la expresión del gen con IPTG y se comparó la actividad de Taq DNA polimerasa en extractos celulares preparados por sonicación y lisozima. Los resultados se muestran en la *Figura 3*, donde los carriles 1 y 3 corresponden al

procedimiento de lisozima en LB y TB respectivamente, mientras que los carriles 2 y 4 corresponden al procedimiento de sonicación en LB y TB respectivamente. Se observa que en el medio LB la actividad de Taq DNA polimerasa fue un poco mayor que la obtenida en TB (comparar carril 1 vs 3), pero fue equivalente entre los carriles 2 y 4.

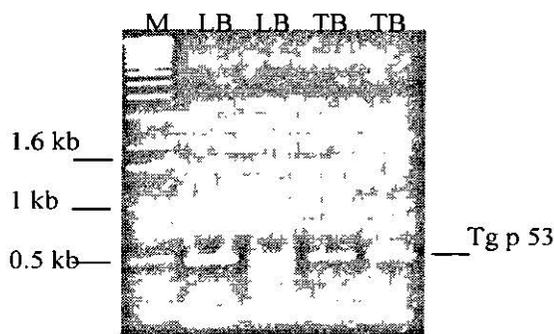


Figura 3. Actividad de Taq DNA polimerasa obtenida de dos medios diferentes: LB y TB. Carriles 1 y 3 extractos celulares preparados por sonicación; carriles 2 y 4 extractos celulares preparados con lisozima.

Para corroborar el resultado antes mencionado se repitió la detección de actividad Taq DNA polimerasa probando diluciones de los extractos celulares (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Los resultados se muestran en la *Figura 4*, donde se observa que los productos de la reacción de PCR son más intensos en los extractos celulares de las bacterias crecidas en LB (carriles 1 al 4) en comparación con los extractos obtenidos del crecimiento en TB (carriles 6 al 9).

Este resultado nos indica que existe una mayor cantidad de actividad enzimática de Taq DNA polimerasa en las bacterias crecidas en LB.

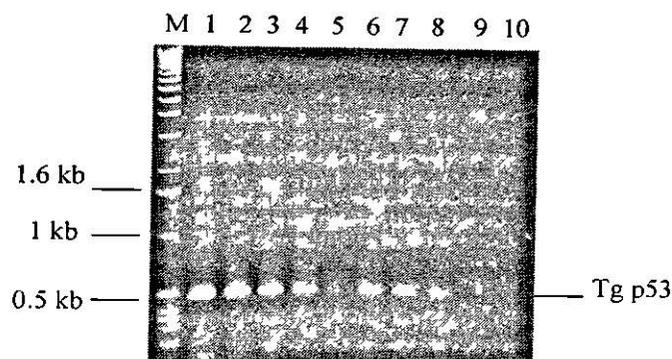


Figura 4. Determinación de la productividad de Taq DNA polimerasa en dos medios de cultivo: LB y TB. Los carriles del 1 al 5 corresponden a diluciones (1:2,1:4,1:8,1:16) del extracto celular obtenido del medio LB, los carriles del 6 al 10 son las diluciones (1:2,1:4,1:8,1:16) del extracto celular obtenido del medio TB.

4. Purificación de Taq DNA polimerasa.

En base a los resultados anteriores se creció la bacteria recombinante en medio LB y se indujo con IPTG por 12 horas. Se siguió el procedimiento de purificación descrito en la sección de Metodología para la purificación de la enzima. Se monitoreó la purificación de la Taq DNA polimerasa a través de las diferentes etapas del procedimiento mediante ensayos de actividad enzimática de DNA polimerasa. Puesto que durante el procedimiento de purificación se trabaja con concentraciones elevadas de sales, primeramente demostramos que se podía detectar actividad de Taq DNA polimerasa bajo esas condiciones. De esta manera pudimos constatar la actividad de Taq DNA polimerasa en el

extracto crudo y en las fracciones eluidas de las columnas de DE52 y Bio-Rex 70. En la *Figura 5* se observa el monitoreo de la presencia de Taq DNA polimerasa después de que se hizo pasar el extracto crudo por la columna de intercambio aniónico (DE52). En los carriles 3 al 13 se observa la banda del transgen humano amplificado a partir del genoma de un ratón transgénico (Tgp53) usando muestras de las diferentes fracciones. Las fracciones que mostraron actividad son de la 3 a la 13, mismas que se mezclaron y dializaron para el siguiente paso de purificación en la columna de Bio-Rex 70. De esta manera descartamos las fracciones 1, 2, 14 y 15 por carecer de actividad de Taq DNA polimerasa.

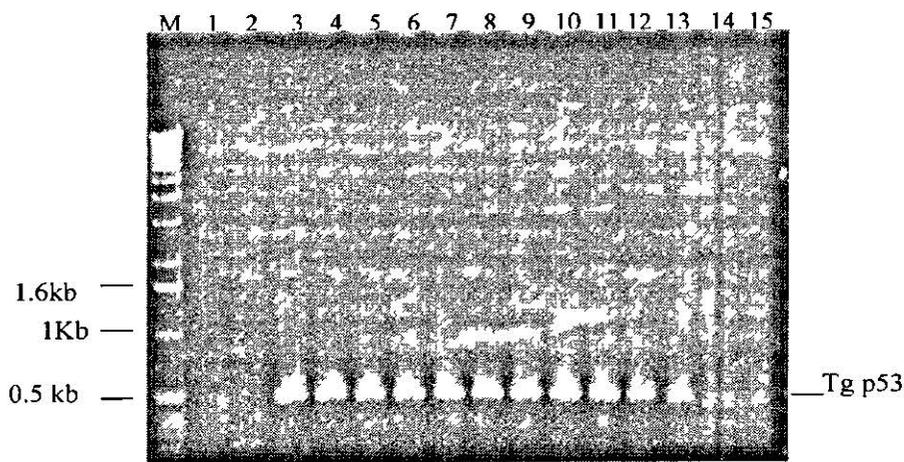


Figura 5. Determinación de actividad de Taq DNA polimerasa en las fracciones eluidas de la columna de DE52. La actividad se determinó amplificando un transgén humano del genoma de ratón de 500 pb. Los carriles 1 al 15 representan las fracciones eluidas. M es el marcador de peso molecular 1 kb.

En la *Figura 6* se observan los resultados de actividad de Taq DNA polimerasa en las fracciones eluidas de la columna de BioRex 70. En los carriles 3 al 12 es donde se observa con mayor intensidad la banda de amplificación del transgen p53 humano (Tg p53) lo que indica que en estas fracciones se eluyó la mayor cantidad de Taq DNA polimerasa. Estos carriles correspondieron a las fracciones 9 al 18, mismas que se juntaron para su diálisis en un buffer de almacenamiento.

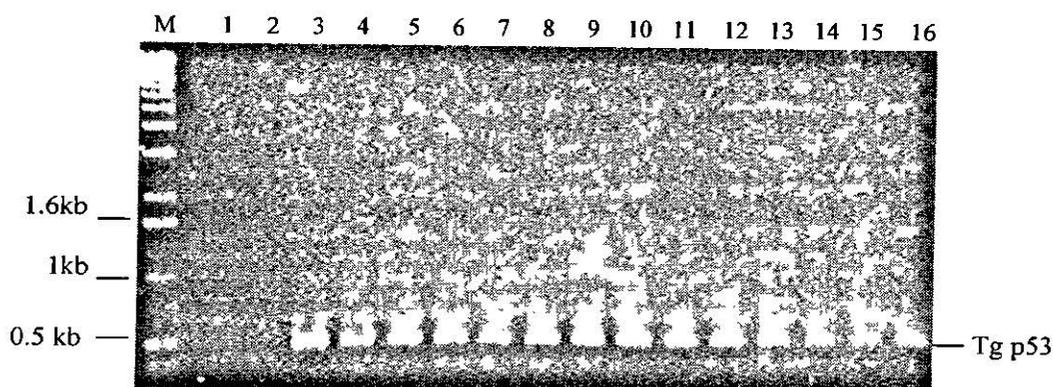


Figura 6. Detección de Taq DNA polimerasa en las fracciones eluidas de la columna de Bio-Rex 70. La Taq DNA polimerasa se eluyó con KCl, se colectaron 20 fracciones y se les determinó la actividad de Taq DNA polimerasa amplificando un transgén humano del genoma de ratón. Los carriles 1 al 16 representan las fracciones eluidas de la 7 al 22. *M* es el marcador de peso molecular 1Kb.

Otra vía mediante la cual se monitoreó la purificación de la Taq DNA polimerasa fue el análisis de las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS. En la *Figura 7* se muestran diferentes patrones de bandeo los cuales indican la cantidad de proteínas presentes durante la purificación de la enzima. El carril 1

corresponde al extracto crudo (lisis celular), como se puede observar se presentan múltiples bandas que indican la presencia de muchas proteínas las cuales deben de incluir la Taq DNA polimerasa. En el carril 5 se encuentran las proteínas del extracto crudo que no se adhirieron a la resina DE52, en donde debe de estar incluida la Taq DNA polimerasa. Estas proteínas se pasaron por una columna de Bio-Rex 70. Las proteínas que se adhirieron a la columna se desprendieron en dos pasos. En el primero se eluyeron proteínas con una concentración de KCl 50 mM las cuales se encuentran en el carril 2; y en un segundo paso se eluyeron proteínas con una concentración de KCl 200mM (concentración a la cual eluye la Taq DNA polimerasa). Estas proteínas se muestran en el carril 3, en donde se observa únicamente una banda. En el carril 4 se presenta una muestra de una proteína Taq DNA polimerasa comercial. Estos resultados indican que el procedimiento de purificación resultó en la obtención de una proteína cuyo tamaño (94 Kd) corresponde al esperado de la enzima Taq DNA polimerasa. En el carril 6, que corresponde a las proteínas que pasan directamente a través de la resina Bio-Rex 70, no se observa ninguna banda. Esto indica que prácticamente todas las proteínas que no se adhirieron a la primer columna (resina DE 52) se quedaron unidas en la columna de resina Bio-Rex 70.

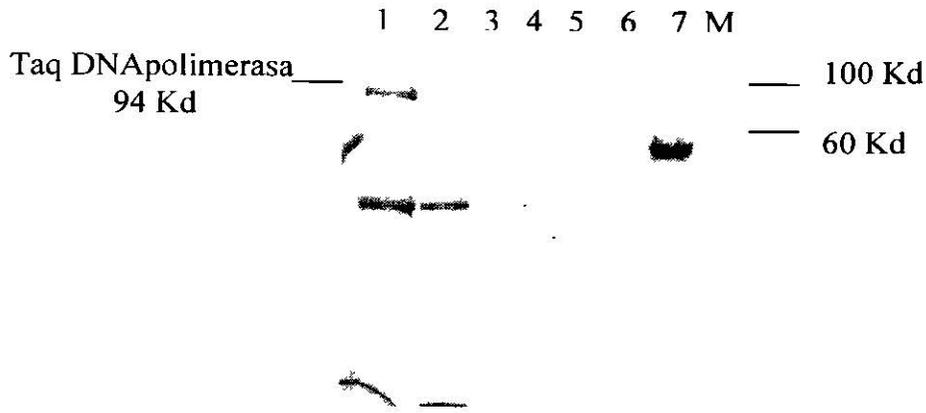


Figura 7. Análisis de la enzima purificada Taq DNA polimerasa en gel de poliacrilamida-SDS durante el procedimiento de purificación de la Taq DNA polimerasa. Carril 1 es el extracto crudo; carriles 2 y 3, eluidos de la resina Bio-Rex 70 con KCl 50 y 200 mM respectivamente; carril 4, Taq DNA polimerasa comercial; carril 5, proteínas no unidas a la columna de DE52; carril 6, proteínas que no unieron a la columna de Bio-Rex 70; carril 7 albúmina, y M marcador molecular de proteínas.

5. Determinación de la actividad biológica de la Taq DNA polimerasa.

Con la Taq DNA polimerasa purificada en este trabajo se lograron amplificar secuencias génicas de copia única a partir de diferentes organismos como son aves, humano y roedores. En la *Figura 8* se muestra un ejemplo de amplificación de DNA aislado de sangre de aves de la familia *Psittacidae* (*Amazona leucocephalla* y *Lory sp*). El producto de PCR corresponde a un fragmento del gen *CHD* de aves. Los carriles con dos bandas (carriles 3, 6 y 8) corresponden a la presencia de dos genes *CHD* diferentes en estas aves.

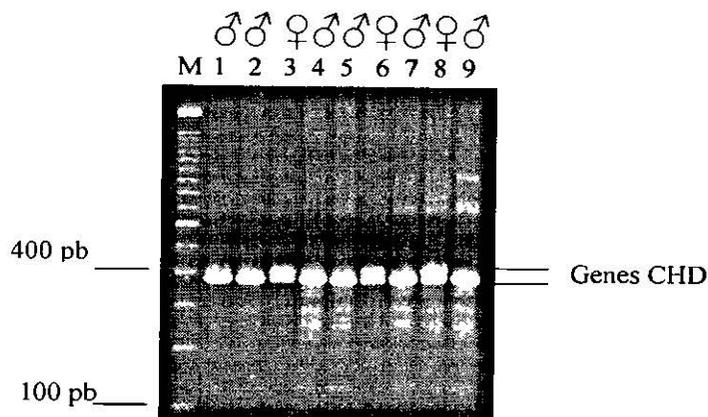


Figura. 8 Amplificación del gen *CHD* de aves usando la Taq DNA polimerasa purificada. Los carriles del 1 al 5 pertenecen a aves de la especie *Amazona leucocephalla* y los carriles del 6 al 9 pertenecen a la especie *Lory sp.*

En la *Figura 9* se presenta la amplificación de genes de copia única a partir del genoma murino usando la Taq DNA polimerasa purificada y su comparación con una Taq DNA polimerasa comercial. En este caso en particular se amplificó el DNA de dos alelos diferentes del gen p53 murino: un alelo silvestre de 450 pb y un alelo mutante de 700 pb.

6. Comparación de la actividad de la Taq DNA polimerasa purificada vs una enzima comercial.

En la *Figura 9* se muestra la comparación de la actividad enzimática de la Taq DNA polimerasa. En esta figura se presenta el análisis de la Taq purificada y almacenada en dos buffers diferentes, y de una Taq comercial. Cada una de las

enzimas se probaron a tres diluciones diferentes (1:2, 1:4 y 1:8). Los carriles 1, 4 y 7 corresponden a la Taq purificada y almacenada en el buffer I; los carriles 2, 5 y 8 a la enzima en el buffer de almacenamiento II, y los carriles 3, 6 y 9 corresponden a la Taq DNA polimerasa comercial; de menor a mayor dilución para cada una de ellas, respectivamente. Como se observa en la figura, la enzima que amplificó los dos alelos esperados a la mayor dilución fue la Taq DNA purificada almacenada en el buffer I.

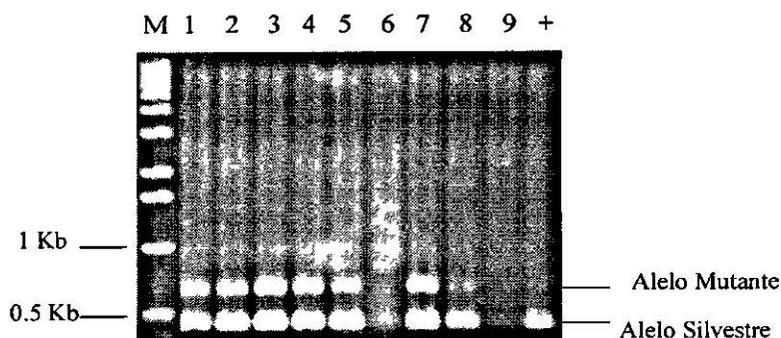


Figura 9. Amplificación del gen p53 heterocigoto a partir del genoma murino M es el marcador de peso molecular 1Kb. Los carriles 1,4,7 corresponden a la Taq purificada y almacenada en el Buffer I. Los carriles 2,6,8 son la Taq purificada y almacenada en el Buffer II. Los carriles 3,7,9 son de la Taq comercial, + es el control positivo

En la *Figura 10* se probó la habilidad de la Taq DNA polimerasa en la amplificación simultánea de varias regiones génicas del genoma humano (PCR múltiple). Específicamente se usaron los oligonucleótidos de un estuche de amplificación de diferentes regiones del brazo largo del cromosoma Y, del cual se sustituyó la Taq DNA polimerasa del estuche comercial por la Taq DNA

polimerasa purificada en este ensayo de PCR. Los resultados observados en la figura corresponden a los esperados en el estuche comercial. Confirmando nuevamente la calidad de la Taq DNA polimerasa purificada en este trabajo.

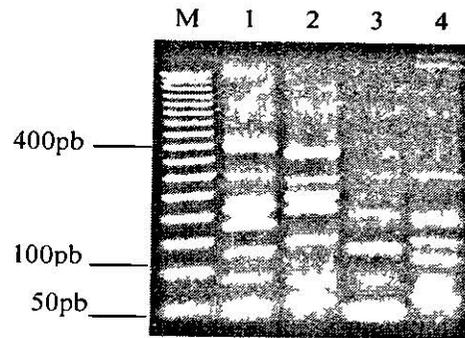


Figura 10. PCR múltiple del brazo largo del cromosoma Y usando la Taq DNA polimerasa purificada. M es al marcador de peso molecular 50pb; carriles 1 al 4 productos de PCR esperados de acuerdo al estuche comercial.

En la *Figura 11* se muestra la capacidad que presentó la Taq DNA polimerasa purificada para amplificar DNA aislado de tejido embebido en parafina. Lo antes mencionado es un gran logro debido a que cuando se aísla DNA a partir de tejido embebido en parafina este puede contener algunos inhibidores de la actividad de la Taq DNA polimerasa. Por lo tanto nuestra enzima fue capaz de actuar en estas condiciones.

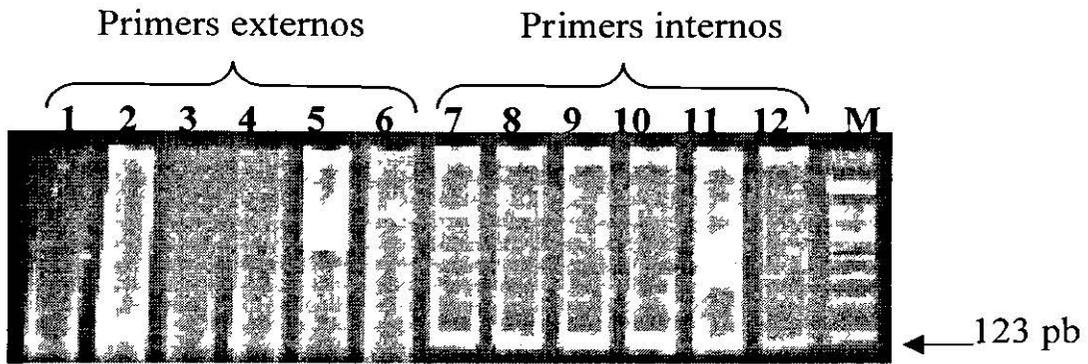


Figura 11. Amplificación tipo “Nested-PCR” de un Fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110 del complejo *M. Tuberculosis*. DNA aislado de tejido bovino embebido en parafina se usó en una primera reacción de PCR (carriles 1 al 6) y posteriormente cada una de las muestras del producto de PCR se sometió a una segunda amplificación usando oligos internos al producto de PCR (carriles 7 al 12).

7. Estabilidad de la Taq DNA polimerasa en dos tipos de buffers de almacenamiento.

En este último resultado se muestra la efectividad de dos diferentes buffers (Buffer I y Buffer II) para el almacenamiento de la Taq DNA polimerasa purificada, en función de su actividad. En la *Figura 12* se muestra el monitoreo de la Taq DNA polimerasa con respecto a su actividad a través del tiempo. Este monitoreo se realizó mediante la amplificación por PCR del Tg p53 humano a partir de genoma murino. El panel A corresponde a la Taq DNA polimerasa recién purificada. Los paneles B, C, D y E corresponden a la actividad de las enzimas con 1, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento, respectivamente. En los tres primeros paneles B, C y D se aprecia que la intensidad de las bandas es

comparable en ambos buffers, es decir que la actividad permanece equivalente entre 1 y 6 meses. Por el contrario a los 9 meses de almacenamiento (panel E) existe una actividad ligeramente mayor en la enzima almacenada en el Buffer I.

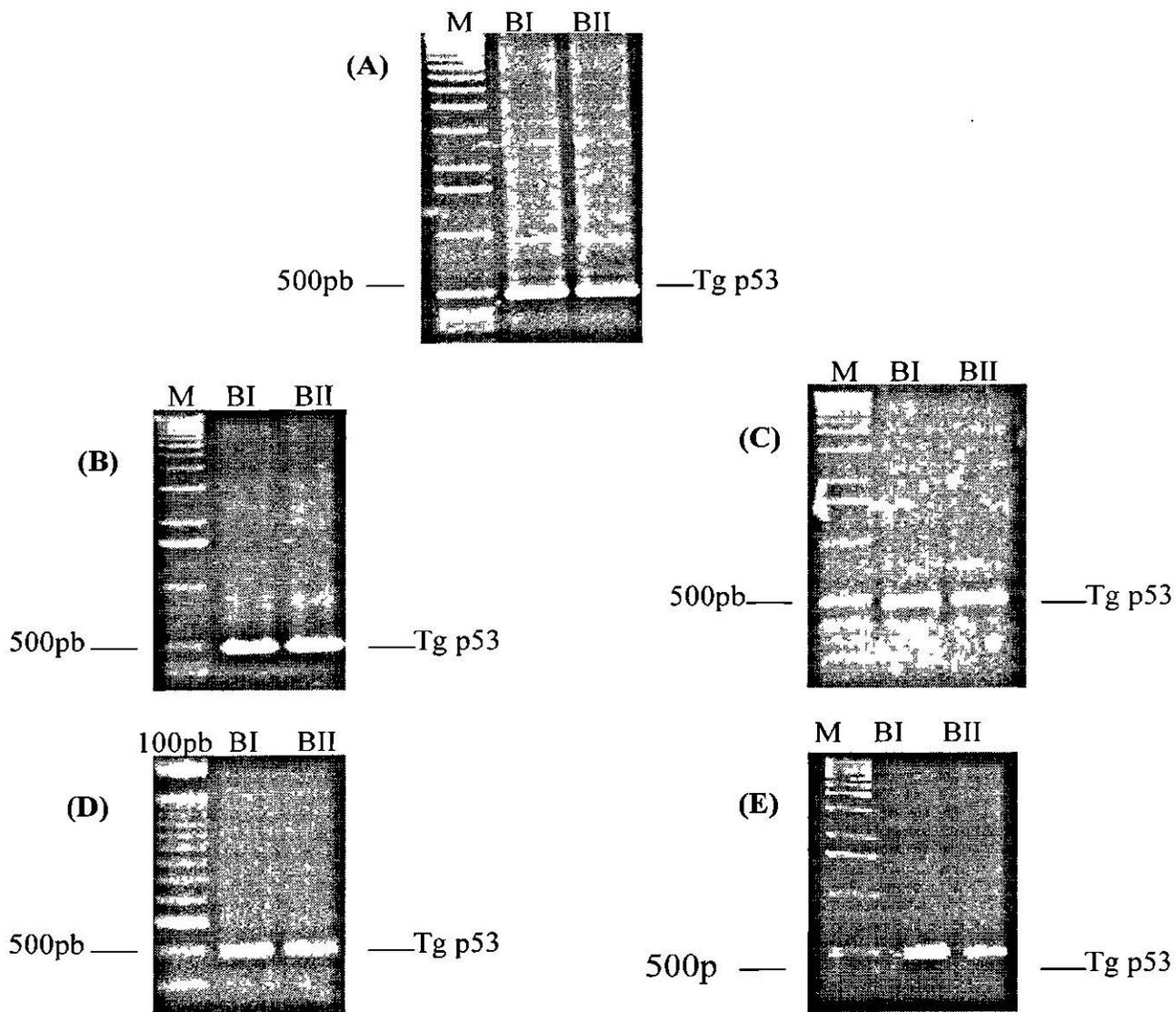


Figura 12. Monitoreo de la Taq DNA polimerasa con respecto a su actividad a través del tiempo en dos tipos de Buffers de almacenamiento (BI y BII). (A) Al tiempo cero (recién purificada), (B) un mes de almacenamiento, (C) tres meses de almacenamiento, (D) seis meses de almacenamiento, (E) nueve meses de almacenamiento. M es el marcador de peso molecular 1Kb.

IX. DISCUSION

En el presente trabajo se describió un procedimiento para la purificación de la enzima Taq DNA polimerasa a partir de una bacteria recombinante de *Escherichia coli*. Gracias a este trabajo se ha generado autosuficiencia en el suministro de esta enzima a nuestro laboratorio.

Puesto que los buffers que se usaron para la purificación de la Taq DNA polimerasa contenían cantidades considerables de sales, primeramente se determinó si la Taq DNA polimerasa era activa en esas condiciones de salinidad, interesantemente si lo fue y se pudo monitorear la actividad de la enzima a través de todos los pasos de su purificación (*Figuras 5, 6 y 7*).

Se presentaron problemas en la obtención de extractos celulares a partir de 1 ml de cultivo bacteriano. Los procedimientos para obtener un lisado bacteriano ya sea con lizozima o por ebullición a partir de 1 ml resultaron en un extracto celular con muy poca actividad detectable de Taq DNA polimerasa. Por el contrario en extractos celulares obtenidos por sonicación a partir de 1 ml de cultivo se logró detectar confiablemente la actividad enzimática; de igual manera, fue posible detectar la actividad de Taq DNA polimerasa en extractos con lizozima a partir de 10 ml.

Las unidades de actividad de la Taq DNA polimerasa se obtuvieron en base a la comparación con una enzima comercial. La Taq DNA polimerasa

purificada presentó una actividad comparable a una enzima comercial que presenta una concentración de $5U/\mu l$ (*Figura 9*). Puesto que en este trabajo se obtuvieron 20 ml de Taq DNA polimerasa a partir de un litro de cultivo, la cantidad de unidades obtenidas corresponden a aproximadamente 100,000 unidades.

La enzima Taq DNA polimerasa que se purificó mantuvo su actividad durante todo el tiempo de análisis, lo que significa que la enzima purificada en nuestras condiciones permanece estable al menos por un período de 9 meses. Así mismo recomendamos el almacenamiento de la Taq polimerasa en el buffer I, ya que es la que conservó mayor actividad a través del tiempo.

La producción de Taq polimerasa en el medio LB fue mayor que en el medio TB. Es conocido que en el medio TB la densidad celular es mayor, es decir que al haber mayor número de bacterias esperaríamos una mayor cantidad de Taq purificada. Sin embargo no resultó ser así, la actividad enzimática fue inclusive un poco mayor en la obtenida en el medio LB. Es probable que la mayor producción de Taq polimerasa en el medio TB se obtenga a un tiempo de inducción diferente que aquel obtenido con el LB.

X. CONCLUSIÓN

Se logró determinar el tiempo óptimo para la producción de la Taq DNA polimerasa, además de determinar que el medio LB es el que proporciona mayor producción de esta enzima recombinante. Se logró monitorear a la Taq DNA polimerasa a través de los pasos para llegar a su purificación y de este modo se implementó un procedimiento para su producción y purificación a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli*.

La Taq DNA polimerasa purificada permanece estable y activa por nueve meses en almacenamiento, además de que logra amplificar regiones genómicas de copia única de diferentes organismos como bacterias, bovinos, ratones y humanos.

La producción de esta enzima es un ahorro económico significativo en los proyectos de investigación en Biología Molecular.

XI. LITERATURA CITADA

[1] Kary Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G.Horn and H. Erlich

1985 Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction. CSH Symp. Quant. Biol. 51: 263-273, Cold Spring Harbor Lab.

[2] Randall K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn and H. Erlich

1985 Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequence and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. SCIENCE. 230: 1350-1354.

[3] Randall K. Saiki, L. Bugawan, T. Horn, K. Mullis & H. Erlich

1986 Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. NATURE. 324: 163-166.

[4] Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM & Stass SA

1987 Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. SCIENCE. 10; 237 (4811): 175-178.

[5] Randall K. Saiki, H. Gelfand, S. Stoffel, J. Scharf, R. Higuchi, T. Horn, K.

Mullis 1988 Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. SCIENCE. 239: 487-491.

[6] Frances C. Lawyer, S. Stoffel, K. Saiki, K. Myambo, R. Drummond & H.

Gelfand 1989 Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase Gene from *Thermus aquaticus*. J. of Biological Chemistry.

264: 6427-6437.

- [7] Thomas RH, Schaffner W, Wilson AC, Paabo S 1989 DNA Phylogeny of the extinct marsupial wolf. NATURE. 10; 340 (6233): 465-467
- [8] David R. Engelk, A. Krikos, E. Bruck, & D. Ginsburg
1990 Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase Expressed in *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry. 191: 396-400.
- [9] Ke-hui Cui, G M. Warnes, R. Jeffrey, and C. Matthews
1994 Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. Lancet. 343: 79-82.
- [10] Peter Radstrom, A. Bakman, NY Qian, P. Kragstjerg, C. Pahlson, and P. Olcen 1994 Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococci* Using a seminested PCR Strategy. J. of Clinical Microbiology. 32;11: 2738-2744.
- [11] Herve Lerat, F. Berby, M-A. Trabaud, O. Vidalin, M. Major, C. Trepo, and G. Inchauspe. 1996 Specific Detection of Hepatitis C Virus Minus Strand RNA in Hematopoietic cells. J. Clin. Invest. 97;3:845-851.
- of PCR-Inhibiting Samples. Applied and Environmental Microbiology. 64;10: 3748-53.

[12] Nora M. Carroll, Peter Adamson and Narciss Okhravi. 1999 Elimination of Bacterial DNA From Taq DNA polymerase by Restriction Endonuclease Digestion. Journal of Clinical Microbiology. 37; 10: 3402-04.

