

Soluciones limpias: agua para la purificación de glutatión S-transferasa (GST) mediante cromatografía de afinidad

Jan Erwig, M.Sc. Centro de investigación Schwann-Schleiden de Biología Celular y Molecular, departamento de Biología Celular de las Plantas, Georg-August Universität Göttingen.
Dr. Elmar Herbig. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento para el aislamiento de proteínas de soluciones. Este principio fundamental (1) se utiliza desde hace tiempo en los laboratorios. La utilización de sistemas de cromatografía líquida rápida de proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) permite obtener una gran cantidad de proteína objetivo de gran pureza.

En este trabajo se describen ensayos de purificación de la proteína glutatión S-transferasa (GST) en el contexto de los trabajos para determinar las funciones de proteínas que influyen en la interacción plantas-patógenos (*Arabidopsis thaliana*). GST se añade a la proteína en forma de marcador («tag») para purificarla por medio de cromatografía de afinidad. Las GST desempeñan un papel importante en la descontaminación de sustancias orgánicas externas (los denominados xenobióticos). Para obtener información detallada sobre la función y regulación de GST en plantas, consulte (2). En la purificación de esta proteína es especialmente importante limpiar todas las sustancias utilizadas. Por tanto, es necesario dosificar todas las sustancias químicas y soluciones en agua ultrapura.

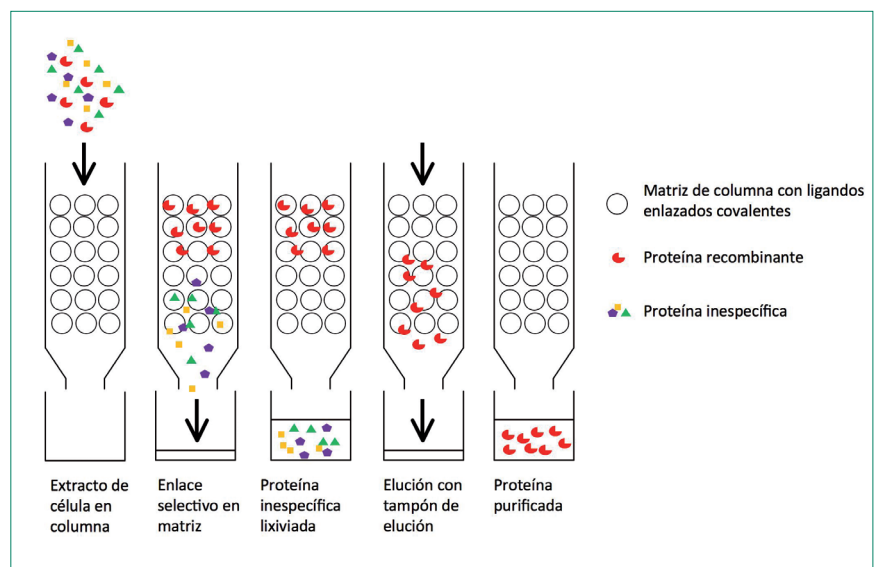


Figura 1. El extracto celular total, que contiene la proteína recombinante buscada, se añade a la columna correspondiente. Las proteínas enlazadas inespecíficas se lixivian y se eluye la proteína enlazada específica con glutatión en forma reducida. (Croquis de Jan Erwig inspirado en el modelo de Bende 1974 (1).)

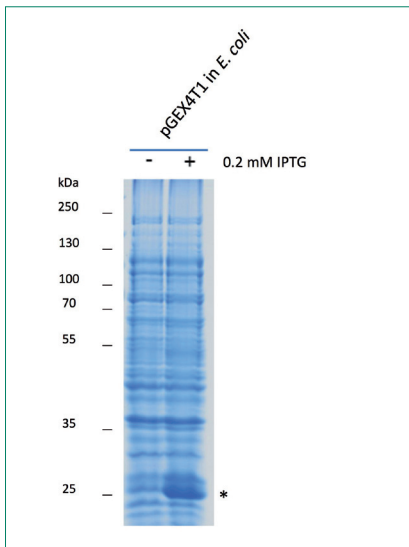


Figura 2. SDS-Page de un gel de acrilamida al 10% al que se aplicó el extracto celular total de SDS de las células sin inducir (-) e inducidas (+) de *E. coli*. Gel tintado con azul de Coomassie coloidal. GST marcado con *.

Principios básicos de la cromatografía de afinidad

Para la purificación se añade por métodos de biología molecular (tales como clonación y transformación) un marcador adicional a la proteína objetivo, lo que da lugar a una proteína recombinante. El objetivo de la cromatografía de afinidad es purificar la mayor cantidad de la proteína recombinante. Para ello, la construcción genética correspondiente se introduce frecuentemente con antelación en sistemas bacterianos (clonación), donde se sobreexpresa. Como organismo huésped se utiliza en la mayoría de los casos la bacteria *Escherichia coli*, pero también se usan cepas de bacilo o sistemas no bacterianos, como levaduras, células de mamíferos o de plantas (3).

La purificación se basa en la interacción específica entre dos compuestos de reacción. Un compuesto de reacción es el marcador de proteína y el otro es un ligando o anticuerpo covalente enlazado a una matriz. En estos ligandos, la proteína recombinante (o el marcador) se enlaza de forma específica.

Tras el lavado de la proteína inespecífica, la proteína objetivo se puede eluir de forma específica mediante un competidor (véase el ejemplo de la Figura 1).

La elección de la matriz de columna depende en este caso del marcador de proteína elegido. Este debe cumplir diversos requisitos, como una alta especificidad de la matriz, facilidad de demostración, elución con sustancias de bajo peso molecular y la posibilidad de proteínas de fusión N-terminales y C-terminales. Además, en lo posible los marcadores no deben tener ninguna influencia en la estructura terciaria ni influir en la actividad biológica de la proteína (4). En el ejemplo mostrado aquí, se purifica la glutatión S-transferasa (GST) mediante una matriz con glutatión proveniente de un extracto de células. La GST tiene un tamaño de unos 26 kDa y es por tanto varias veces mayor que, por ejemplo, un marcador de polihistidina (1 kDa). Las ventajas de los marcadores de proteína grandes son una solubilidad potencialmente mejor de la proteína recombinante y una purificación más específica. Muchos marcadores de polipéptidos más cortos se purifican mediante matrices en las que se pueden enlazar en menor medida proteínas inespecíficas. En tal

caso la fracción depurada es menos pura, comparada con el marcador de GST, por ejemplo. La elución de la proteína recombinante enlazada se consigue principalmente mediante enlace competitivo de ligandos libres o bien modificando el valor de pH o de la concentración de sales. En el ejemplo anterior, la purificación de la GST se muestra con cromatografía líquida de proteínas. Por la compleja estructura del sistema, es indispensable un trabajo preciso y, sobre todo, limpio, así como materiales ultrapuros, el agua incluida. Así, por ejemplo, unos valores de pH fluctuantes y unas concentraciones de sales cambiantes pueden influir en el comportamiento de enlace y de elución, lo que falsearía los resultados. La GST enlazada se eluye de la columna con glutatión en forma reducida y se recoge en diferentes fracciones. A continuación se examina la pureza de estas fracciones.

Materiales y métodos

Para la depuración se inoculó un cultivo líquido con células de *E. coli* TOP10, transformadas con vector de expresión pGEX4T1, y se dejó madurar hasta una DO600 ~0,6.

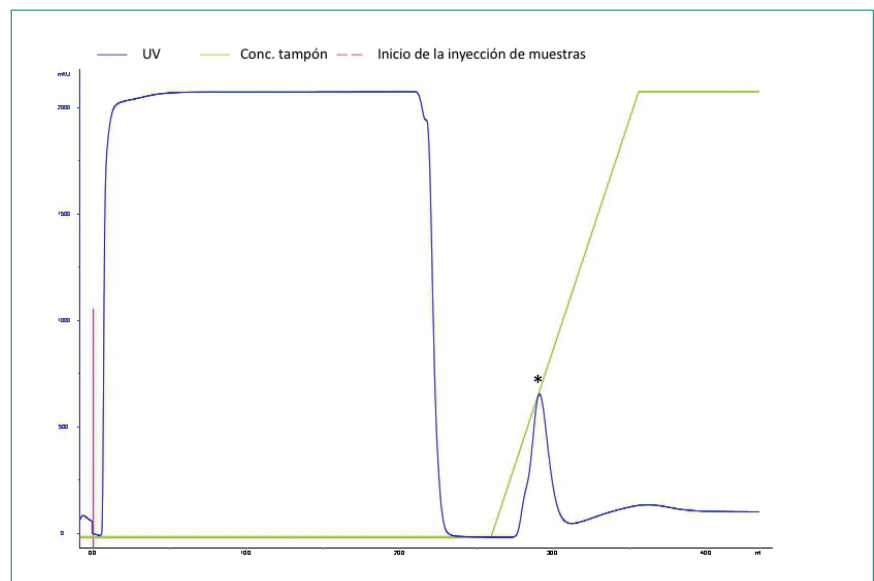


Figura 3. Diagrama de flujo de la cromatografía de afinidad. El cromatograma permite un análisis directo de los diferentes parámetros. Se muestran la absorción UV (azul), la concentración del tampón de elución (verde) y el inicio de la carga de la muestra en la columna. Pico de elución marcado con *.

cromatografía de afinidad

Matriz de columna con ligandos enlazados covalentes
Proteína recombinante
Proteína inespecífica

Extracto de célula en columna
Enlace selectivo en matriz
Proteína inespecífica lixiviada
Elución con tampón de elución
Proteína purificada

Se añadió el inductor (IPTG) con una concentración final de 0,2 mM y acto seguido se siguió agitando el cultivo durante 4 horas a 28 °C. Antes y después de la inducción se tomó 1 ml de cultivo cada vez como control. A continuación se centrifugó el cultivo líquido y se resuspendió y lisó el pellet en tampón de PBS frío que contenía PMSF y lisozima. El lisado celular se centrifugó a 24.000 x g. Después de cada paso se tomaron muestras de control. El sobrenadante se transfirió y se desgasificó en un baño ultrasónico. La purificación se realizó y se evaluó en un sistema de cromatografía de afinidad. Puesto que el sistema mide también la absorción de la muestra durante la purificación, la proteína objetivo se puede identificar por un aumento de la absorción UV en la elución con glutatión en forma reducida. La proteína purificada se recogió en fracciones de 200 µl. Para el análisis posterior mediante SDS-PAGE se mezclaron 20 µl de fracciones de picos individuales o dos agrupadas con 4 tampones de carga SDS y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%.

El gel se tintó luego con Coomassie coloidal (véase 5). Todos los tampones, soluciones y medios se prepararon para los ensayos con agua ultrapura del sistema arium pro (Sartorius).

Resultados

Para examinar la expresión de la proteína objetivo, se digirieron células *E. coli* inducidas y no inducidas directamente en SDS y se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% (véase Figura 2). La GST tiene una masa molecular de unos 26 kDa. Las células inducidas muestran aquí una cantidad claramente

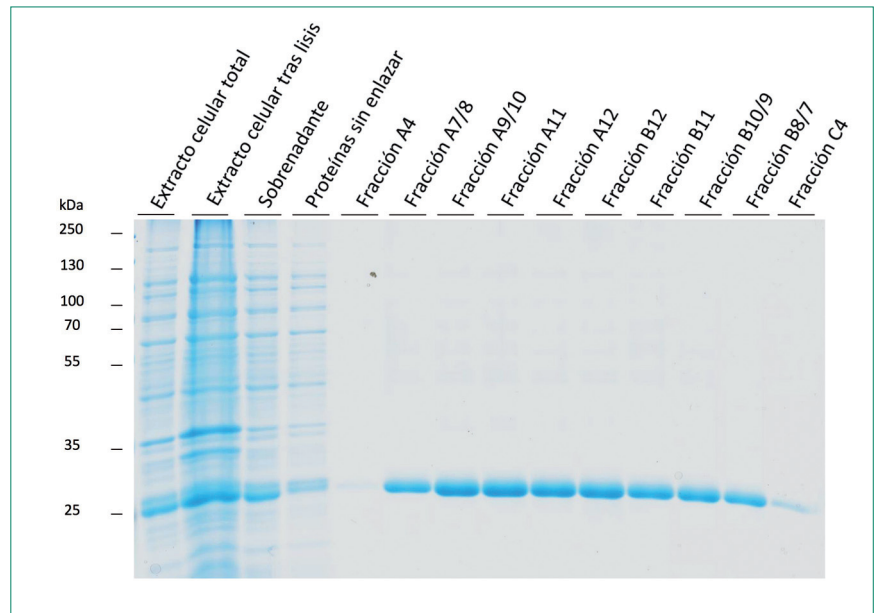


Figura 4. Gel de SDS-PAGE al 10% tintado con Coomassie coloidal que muestra la GST purificada en fracciones no de pico y de pico. Controles: Extracto celular total, parte no soluble tras lisis celular (extracto celular tras lisis), parte soluble que se utilizó para la cromatografía (sobrenadante) y proteína no enlazada.

mayor de una proteína en el mismo tamaño (véase Figura 2: *). Luego se lisaron las células no inducidas y el lisado celular se separó en fracciones solubles e insolubles mediante centrifugación (véase Figura 4). La purificación de una proteína mediante cromatografía de afinidad asume que la proteína que se va a purificar sea soluble en fase acuosa. La solubilidad de la GST se confirmó mediante SDS-PAGE con posterior tintado de Coomassie (Figura 4).

La fracción de proteína soluble se utilizó para la cromatografía de afinidad. El software permite el seguimiento de la depuración en tiempo real (cromatograma, Figura 3). La carga de la columna con la muestra de proteína provoca un aumento de la absorción UV (línea azul en la Figura 3). Tras una carga correcta, el valor de UV disminuye. La GST se puede ver en el primer tercio de las fracciones de elución como un claro pico en la absorción UV (estrella en Figura 3). Después de la purificación, se examinaron las respectivas fracciones en términos de contenido de proteína y pureza mediante SDS-PAGE. Se cargaron los respectivos controles (extracto de célula total, extracto de célula tras lisis, sobrenadante y proteína

sin enlazar), así como las fracciones dentro (A7-B7) y fuera (A4 y C4) del pico de UV. Se puede observar que las fracciones de pico contienen la proteína objetivo en mayor cantidad y pureza (Figura 4). En comparación con los controles, se puede ver una clara banda de proteína en 26 kDa, que presenta el mayor contenido de proteína en las fracciones de pico A11-B12. Asimismo, en la comparación del sobrenadante utilizado y el contenido de proteína sin enlazar se puede ver que la GST expresada y soluble se consiguió purificar casi completamente.

Conclusión

La purificación y el aislamiento de proteínas específicas y el posterior análisis bioquímico de las mismas es un método importante para comprender mejor la función de la proteína. Los resultados demuestran que la proteína examinada se pudo aislar claramente como banda diferenciada. Esta clara separación solo puede conseguirse con soluciones absolutamente limpias. La base para las soluciones utilizadas fue agua ultrapura, que podía utilizarse sin problemas para la realización

cromatografía de afinidad

de los ensayos, porque se distingue por su constante alta calidad respecto de todos los valores requeridos, como por ejemplo conductividad, TOC y contenido en sales. La identificación mediante electroforesis en gel no mostró estrías perturbadoras, enfoque erróneo ni bandas de proteína inespecíficas, como puede ocurrir en presencia de sales o partículas orgánicas cargadas en las soluciones (6). Para obtener evaluaciones de gel fiables y reproducibles es preciso prestar atención a la higiene de los tampones y las soluciones de tinción. Puesto que el procedimiento de ensayo aquí descrito, desde el cultivo de bacterias, pasando por la elaboración de las soluciones y los análisis cromatográficos hasta la electroforesis en gel final, abarca trabajos intensos, de coste elevado y que requieren mucho tiempo, se excluye desde el principio la utilización de agua o sustancias químicas no purificadas. Por ello no se pudo realizar una comparación directa con diferentes calidades de agua ultrapura.

Según (6), el agua ultrapura acabada de preparar, a diferencia del agua de botella, se debe aplicar en un gel 2D para una mayor cantidad y una mejor distribución de los puntos de proteína.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer especialmente al Prof. Volker Lipka su asesoramiento científico durante el trabajo, y a la Dra. Elena Petutschnig (ambos del Centro de Investigación de Schwann-Schleiden de Biología Celular y Molecular, departamento de Biología Celular de las Plantas, Georg-August Universität Göttingen) la revisión del manuscrito y las discusiones constructivas sobre el tema.

Bibliografía

1. Bende, Heinz: Affinitäts-Chromatographie, *Chemie in unserer Zeit*, 8. Jahrgang, Nr. 1 (1974)
2. Marrs, Kathleen A.: The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:127-158 (1996)
3. Terpe, K.: Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 211-222, (2006)
4. Terpe, Kay: Protein-Affinitäts-Tags, *BIOspektrum* 0.4 07, 13. Jahrgang (2007)
5. Dyballa, N.; Metzger, S.: Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *JoVE*.30, (2009). <http://www.jove.com/details.php?id=1431>, doi:10.3791/1431
6. Tarun, M.; Mabic, S. y Schrader, M.: Auf die Reinheit kommt es an - Laborwasserqualität beeinflusst die Proteinauftrennung, *Laborpraxis* pág. 48-50, Oct. (2011)