

EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE UNA AZOREDUCTASA RECOMBINANTE DE *Bacillus subtilis*

Pérez Gómez Claudia Madaí (1), Díaz Trujano Rocío Rubí (2), Ramírez Ramírez Norma (2),
Pedraza Reyes Mario (2)

1 [Ingeniería Agroindustrial, Universidad politécnica de Chiapas] | [claudiapg305@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]
| [pedrama@ugto.mx]

Resumen

Las industrias generan grandes cantidades de contaminantes entre ellos los colorantes tipo “azo” y el cromo(VI) por ello la biorremediación con microorganismos o las enzimas que estos producen como la proteína YhdA pueden ser una alternativa para contrarrestar los efectos nocivos de estos contaminantes. El gen *yhdA* de *Bacillus subtilis* codifica para una proteína que pertenece a un grupo de enzimas denominado FMN- Oxido Reductasas, estas reducen el Cr (VI) a Cr (III) sin generar subproductos. En el presente trabajo se utilizaron herramientas moleculares para generar las condiciones óptimas en la inducción y purificación de la proteína YhdA de *B. subtilis* sobreproducida en un huésped heterólogo.

Abstract

The industries generate large quantities of contaminants including type “azo” dyes and chromium (VI), so bioremediation of polluted environments with microorganisms or enzymes produced by them like the protein YhdA are excellent alternatives to counteract the noxious effects of pollutants. The *yhdA* gene from *Bacillus subtilis* codes for a protein belonging to a group of enzymes called FMN-Oxido Reductases that reduce Cr (VI) to Cr (III) without generating by-products. In the present work molecular tools were used to generate the optimal conditions in the induction and purification of the YhdA protein overproduced in a heterologous host.

Palabras clave

B. subtilis, Azoreductasas, Cromatoreductasas,,YhdA, Expresión heteróloga,

INTRODUCCIÓN

La industria textil, curtiduría, farmacéutica etc. son distintos enseres de uso humano; sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua y las aguas residuales que se generan, contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza [1, 2]. Entre los contaminantes se destacan los colorantes tipo “azo” y el cromo hexavalente (Cr VI) [1, 2].

La presencia de colorantes en las aguas residuales representa un problema ambiental, ya que este tipo de compuestos no puede eliminarse con los métodos de tratamiento convencionales [1].

Las azoreductasas (AZR) se han caracterizado como enzimas que pueden degradar los colorantes azoicos reduciendo los grupos azo [1].

El gen *yhdA* de *Bacillus subtilis* que codifica para una oxidoreductasa dependiente de flavin mononucleótido (FMN), se clonó y se expresó heterológamente en *Escherichia coli*, encontrándose que esta posee actividad de azoreductasa [3].

El Cr (VI) es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y mutagénico en bacterias [2, 4]. Se ha propuesto que la toxicidad del Cr(VI) se debe a que éste, al igual que otros metales, genera estrés oxidativo; en este proceso dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que, en presencia de H₂O₂, funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, llevando a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) [5].

En un reporte reciente se encontró que el gen *yhdA* mostró 63% de homología con la proteína ChrR de *E. coli*, una enzima con capacidad de reducir el Cr (VI) a Cr (III) sin generar subproductos parcialmente reducidos que son citotóxicos y genotóxicos [6].

Por lo que en nuestro laboratorio se estudia el potencial de esta enzima en la reducción del Cr (VI) a Cr (III) y su aplicación en la remediación de desechos acuosos generados por las industrias del cuero.

Existen métodos alternativos para la eliminación del cromo, la forma de eliminación de metales de los efluentes industriales suele ser por precipitación química en medio básico, para formar hidróxidos, sin embargo el cromo hexavalente no forma hidróxidos insolubles y es necesario recurrir a otros procedimientos. Una alternativa es el uso de microorganismos capaces de reducir el Cr (VI) [5, 7, 8].

En nuestro grupo de trabajo se generó una cepa recombinante de *E. coli* capaz de sobreexpresar al gen *yhdA* y generar cantidades exacerbadas de la proteína YhdA unida a una etiqueta de 6 histidinas [6].

En el presente estudio se determinaron las condiciones óptimas de inducción del gen *yhdA* así como una estrategia para purificar la proteína recombinante His₆-YhdA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana, material para purificación y medio de cultivo.

La cepa que se utilizó en este estudio denominada *E. coli* PERM 1562, la cual porta una construcción que sobreexpresa el gen *yhdA* desde un promotor inducible por IPTG [6].

Para el crecimiento y propagación de esta cepa se empleó el medio Luria-Bertani (LB), el cual contiene: extracto de levadura 0.5%; peptona biotriptasa 1% y cloruro de sodio 0.5% (p/v) por cada litro de medio. El crecimiento en medio sólido se efectuó en LB conteniendo 2% de agar bacteriológico (P/V). El medio se suplementó con Cloranfenicol (Cm; 25 µg/mL) y Ampicilina (Amp; 100 µg/mL).

Los cultivos en medio sólido fueron crecidos a 37°C. Los cultivos líquidos fueron incubados con

aireación, a 37°C, en un incubador metabólico orbital LAB LINE (Cook Country, Illinois, USA) ajustado a 250 rpm. La densidad óptica (D.O.) de los cultivos líquidos se determinó a 600 nm en un espectrofotómetro Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech, USA).

Ensayos de inducción de la proteína quimérica His₆-YhdA.

El ensayo de inducción de la proteína expresada en *E. coli*, se llevó a cabo en cultivos de 25 mL de LB suplementados con Cm y Amp. Estos se inocularon con preinóculos de 12 h y se crecieron a 37° C con agitación constante (250 rpm), hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0,5 (aproximadamente 5 X 10⁷) células/mL).

El cultivo se dividió en 2 matraces, uno de ellos se suplemento con una concentración final de 0.5 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG); el restante se usó como control. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C y 250 rpm. Se recolectaron muestras a la 1, 2 y 3 h. Las células se recuperaron por centrifugación (15,800 x g) y se resuspendieron en 100 mM Tris-HCl pH 7.5.

Purificación de la proteína His₆-YhdA por cromatografía de afinidad metálica.

Para la purificación de la proteína His₆-YhdA se inoculó un cultivo de 250 mL de medio LB suplementado con Amp y Cm con la cepa *E. coli* PERM1562 a una DO₆₀₀ 0.5. En este punto se agregó IPTG (0.5 mM) y se continuó la incubación por 2 h bajo las condiciones descritas.

El cultivo se centrifugo a 4000 x g y posteriormente las células se resuspendieron en 1 ml de buffer Tris-HCl 100 mM conteniendo NaCl 300 mM, de pH 7.5 (Buffer A). A continuación, las células se rompieron por sonicación en un homogenizador SONIC Vibra Cell, (Newtown, CT. USA) utilizando 4 ciclos de 30 s a 11 micrones alternados por 1 min en hielo. Finalmente, el lisado celular se

centrifugó a 4192 x g, 4°C, durante 15 min y el sobrenadante se almacenó a -70°C.

La purificación de la proteína se realizó en una columna de 3 mL de Ni-NTA agarosa equilibrada con Buffer A. El extracto celular se aplicó a la columna, la cual se lavó con tres volúmenes de buffer A conteniendo 20 mM de imidazol. La proteína unida se eluyó de la columna con buffer A conteniendo 150 mM de imidazol. Durante el último paso se colectaron fracciones de 1 mL, las cuales se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Antes de aplicar las muestras al gel, estas se mezclaron 1:1 con buffer de carga 2X [Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, 20 ditiotreitól (DTT) 31 mg/mL] y se hirvieron durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó en un sistema mini-protein Electrophoresis System a 30 mAmp constantes y en amortiguador compuesto por Glicina 0,2 M, Tris Base 25 mM, SDS 0,1% (p/v). Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie 0.025% (p/v).

Diálisis.

Las muestras de proteína purificada se sujetaron a elución en una membrana de celulosa con buffer de Tris-HCl 100 mM de pH 7.5 para eliminar el imidazol y el NaCl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la inducción de la expresión de una fusión *his₆-yhdA* en *E. coli*.

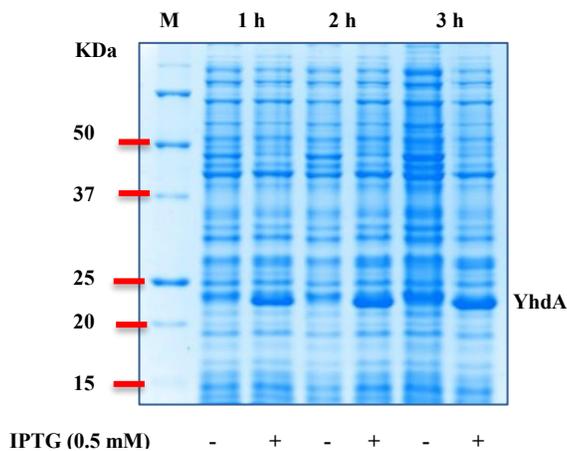


Figura 1. Análisis electroforético mediante SDS-PAGE del extracto celular de la cepa *E. coli* PERM1562 inducida con 0.5 mM de IPTG, durante 3 h. Un cultivo de la cepa *E. coli* PERM1562, llevado a la fase logarítmica, se trató con IPTG durante 3 h. Al finalizar el tiempo de inducción, las células se cosecharon por centrifugación, se sometieron a sonicación para obtener el extracto celular tal y como se describió en Materiales y Métodos. Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15%. Carril 1, marcadores de peso molecular de proteínas; carril 2, extracto celular de PERM1562 sin inducir; carril 3, pastilla celular; carril 4, extracto celular de PERM1562 inducido; carril 5, sobrenadante del extracto celular. La flecha muestra la posición en el gel de la proteína His₆-YhdA recombinante.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se obtuvo una construcción para sobre-expresar el gen *yhdA* en *E. coli* y obtener un producto conteniendo una etiqueta de 6 histidinas en su extremo amino-terminal [6]. Esta construcción contenía el marco de lectura abierto clonado en el vector de expresión pET19b. Sin embargo, a la fecha se desconocían las condiciones óptimas para lograr la inducción del gen *yhdA* y purificar su producto. Para abordar estos puntos, la cepa *E. coli* PERM1562 se creció como se describe en Materiales y Métodos.

Las muestras celulares obtenidas de las distintas condiciones de inducción se lisaron y los extractos celulares se sujetaron a centrifugación para recuperar las fracciones solubles y particulada, las cuales se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados de este análisis (Fig. 1) mostraron que la inducción de la expresión del gen *yhdA* utilizando 0.5 mM de IPTG y 2 h de incubación es apropiada para obtener cantidades suficientes de proteína recombinante en forma soluble para su purificación.

Purificación de la proteína His₆-YhdA.

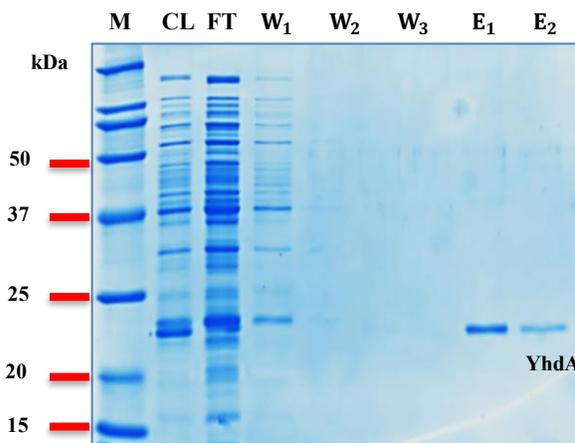


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína His₆-YhdA por cromatografía de afinidad metálica en una columna de Ni-NTA. Agarosa. Los extractos libres de células de un cultivo inducido con IPTG de la cepa *E. coli* PERM1562 se purificaron en una columna de Ni-NTA agarosa como se describió en Materiales y Métodos. M, marcadores de peso molecular de proteínas; CL, extracto celular soluble; FT, proteínas no unidas a la columna; carril W₁,W₂,W₃ lavado 1 con buffer a y 20 mM de imidazol; E₁,E₂, His₆-YhdA purificada eluída con 150 mM de imidazol.

Tomando en consideración los resultados del análisis de la inducción de la expresión del gen *yhdA* de *B. subtilis* en *E. coli* se procedió a la purificación de la proteína His₆-YhdA producida por esta cepa. Para ello, se partió de un cultivo de 250 mL el cual se suplementó con 0.5 mM de

IPTG y se incubó durante 2 h a 37 °C. Las células cosechadas se lisaron por sonicación y el extracto celular obtenido se centrifugó para separar la fracción soluble de la fracción particulada.

La purificación de la proteína se efectuó a partir de la fracción soluble, la cual se aplicó a una columna de Ni-NTA agarosa; los lavados se realizaron con imidazol 20 mM y la proteína His₆-YhdA se eluyó con imidazol 150 mM. Las muestras obtenidas de las distintas etapas de la purificación se analizaron por SDS-PAGE. La Figura 2 muestra que el protocolo de purificación implementado permitió la recuperación de una sola proteína con la masa molecular esperada para la enzima His₆-YhdA; es decir, de alrededor de 21.5 kDa.

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones óptimas para la inducción del gen *yhdA* y sobreproducción de la proteína His₆-YhdA en *E. coli*.

Utilizando cromatografía de afinidad metálica, se purificó a homogeneidad la proteína recombinante His₆-YhdA.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP-936-2016 y 1090-2016). CM. Pérez Gómez **agradece** la beca otorgada por la DAIP durante la estancia de Verano 2017.

REFERENCIAS

[1] Sudha M, Saranya A, Selvakumar G, Sivakumar N. 2014. Microbial degradation of Azo Dyes: A review. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3: 670-690.

[2] Gutiérrez-Corona, JF. & Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: Mecanismos y potencial biotecnológico. CONCYTEG 37(3), 21-36.

[3] Deller S, Sollner S, Trenker-EI-Toukhy R, Jelesarov I, Gubitz GM & Macheroux P. (2006). Characterization of a Thermostable NADPH: FMN Oxidoreductase from the Mesophilic Bacterium *Bacillus subtilis*. Biochemistry, 45(1), 7083-7091.

[4] Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol Rev. 25(3):335-347.

[5] Ramírez-Díaz, Ml., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismo y aplicaciones. REB 28(3), 73-79.

[6] Díaz-Trujano R and Pedraza-Reyes M. (2016). Obtención de una construcción génica para la sobreexpresión homóloga del gen *yhdA* de *Bacillus subtilis*. Appl. Jovenes de la ciencia 1(2), 517-521.

[7] Santos-Escobar F, Gutiérrez-Corona F and Pedraza-Reyes M. (2014). Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system (GO) in counteracting hexavalent chromium-promoted-oxidative DNA damage. Appl. Environ. Microbiol. 80: 5943- 5502.

[8] Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., and Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 70: 873–882.