

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DESOXIRRIBONUCLEASA B DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

ALBA RUTH BUITRAGO*, ZULEIMA ARDILA*, MIGUEL GUZMAN U.**

La nucleasa B es un producto extracelular de una gran variedad de cepas de *Streptococcus pyogenes* que estimula la producción de anticuerpos los cuales son útiles como una confirmación de infección estreptocócica. La cuantificación de antiestreptolisinas y antidesoxirribonucleasa B es un indicador mas seguro para la comprobación de un diagnóstico de infección estreptocócica. Una limitante para su utilización la constituyó en el pasado la obtención de la nucleasa B de actividad homogénea. El trabajo aquí presentado describe la producción y purificación simplificada de la nucleasa B mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-SEPHAROSA-CL-6B.

INTRODUCCION

La desoxirribonucleasa B (DNasa B) es una de las cuatro desoxirribonucleasa producida por el *Streptococcus pyogenes* y como la mayoría de otros productos extracelulares, el título de anticuerpos contra esta enzima aumenta después de una infección estreptocócica (1).

Estudios previos han demostrado que la prueba de anticuerpos anti-DNasa B es útil en el diagnóstico de infecciones streptocócicas en pacientes que presentan complicaciones no purulentas, tales como fiebre reumática, corea y glomerulonefritis aguda postestreptocócica (2, 3) y puede preferirse sobre la anti-estreptolisina O (ASTOS) en pacientes con enfermedades estreptocócicas de piel (4). Un obstáculo para esta estrategia en el pasado ha sido la dificultad de preparar el antígeno homogéneo de la nucleasa B con la respectiva actividad enzimática. La electroforesis en gel de poliacrilamida y la cromatografía de intercambio iónico han sido métodos usados efectivamente para la purificación de la nucleasa B.

MATERIALES Y METODOS

Streptococcus pyogenes: para la producción de la desoxirribonucleasa B se utilizó una cepa de *S. pyogenes* C-203 - S del ATCC.

Substrato: para la determinación de la actividad enzimática se utilizó DNA-verde de metilo (Sigma D-2376).

Cromatografía: para la separación cromatográfica se utilizó un sistema de columna (Pharmacia) y un resina de intercambio iónico, DEAE-sepharose-CL-6B (Pharmacia).

Para preparar la enzima cruda, 1 ml de *Streptococcus pyogenes* liofilizado cepa c-203-S se reconstruyó con 5 ml de caldo Todd-Hewitt y se incubó a 37°C, por 18-24 horas, luego de comprobado el crecimiento el contenido del cultivo se transfirió a un erlenmeyer con 500 ml de caldo Todd-Hewitt y se incubó toda la noche a 37°C, tiempo en el cual el cultivo alcanza su fase estacionaria. El cultivo se enfrió en baño de hielo,

*Estudiantes de pregrado, Facultad de Bacteriología, Universidad de los Andes.

**Profesor Asociado Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

las subsecuentes operaciones se llevaron a cabo a 4°C. El cultivo se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos para remover las células, el sobrenadante se trató con una solución de sulfato de amonio 85%, agitando hasta la precipitación total durante una hora; el precipitado fue colectado por centrifugación durante 10 minutos a 7.000 g. éste fue redisolto en 25 ml de buffer glicina 0.001 M pH 9.0 y dializado durante 5 horas contra 24 volúmenes del mismo buffer, realizando varios cambios.

Después de la diálisis, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (5), al igual que su actividad enzimática, para lo cual se suspendieron 20 mg de DNA-verde de metilo en 100 ml de buffer Tris 0.05 M pH 7.5, con MgSO₄, 0.0001 M pH 7.6 solubilizando a 37°C por agitación toda la noche en agitador magnético. Como solución inhibidora se utilizó citrato de sodio 0.083 M en buffer de Tris 0.004 m pH 7.5. La solución de enzima control se preparó reconstituyendo un frasco de DNasa - I de páncreas bovino (Sigma Chemical Co.) con 1.0 ml de agua destilada. esta enzima se utilizó como patrón o control positivo; poco antes de usarla se diluyó 0.1 ml de la solución anterior en 5.0 ml de agua destilada, lo cual da una concentración de 40 unidades kunitz/ml.

La acción enzimática se evidenció por la hidrólisis del complejo DNA-verde de metilo cuya solución incolora al ser interactuada por la enzima, hidroliza el DNA y permite la liberación del colorante siendo la intensidad medida en términos de absorbancia proporcional a la actividad enzimática (6); a 15 ml de solución de sustrato incoloro mantenida en un tubo de ensayo en baño María a 37°C por pocos minutos, para calentarla, se adicionó 1 ml de solución de enzima cruda mezclando rápidamente por inversión varias veces luego se fraccionó en alícuotas de 3 ml colocándolas nuevamente en baño María; a intervalos de 2 minutos, se adicionó 3.0 ml de la solución inhibidora a cada alícuota, se frenó la reacción a temperatura ambiente en la oscuridad y por un mínimo de 12 horas; posteriormente se leyó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-200 a una longitud de onda de 640 nm usando agua como referencia.

Se calculó el delta de absorbencia A por minuto para la enzima patrón conocida y para la enzima cruda; la concentración en unidades Kunitz por milímetro de solución enzimática utilizada se calculó así:

A por minuto de la enzima cruda

_____ *40 unidades Kunitz
A por minuto de la enzima patrón

Una vez comprobado que el extracto crudo tenía actividad enzimática se procedió a su purificación cromatográfica en columna de 15 x 1.5 cm y DEAE Sepharosa CL 6B previamente tratada; se aplicó 7 ml de la enzima cruda a la columna y se eluyó con buffer fosfatos 0.1 m pH 8.0, a una rata de flujo de 0.3 ml/min., hasta que se obtuvieron 30 fracciones de 3 ml. cada una. Después de leer la densidad óptica (D.O) de cada fracción a longitud de onda de 288 nanómetros y de graficarlas, se hizo un pool de las fracciones correspondientes a cada pico, se procedió luego a medir la actividad enzimática de cada uno y se determinó que el primero era el que contenía la DNasa-B, se almacenó a menos 30° centígrados para uso posterior.

RESULTADOS

Con el procedimiento descrito fue posible aislar y purificar la DNasa-B estreptocócica, con una buena concentración de proteínas, óptima actividad enzimática y alto porcentaje de degradación de sustrato específico. La concentración de proteínas del extracto de nucleasa, fue 8.75 mg/ml; en el primer ensayo de actividad enzimática, se obtuvieron los siguientes resultados para el extracto crudo 30 unidades Kunitz/ml, en la fracción 9,35 unidades Kunitz/ml y la fracción 10, 17.5 unidades kunitz/ml; en el segundo ensayo el porcentaje de degradación de DNA verde de metilo, se obtuvo para el extracto crudo 91.08% de degradación, para la fracción 9,89.18% y para la fracción 10,98.81% de degradación (Tabla No. 1).

La concentración de proteínas totales mayor de 3 mg/ml en el extracto crudo obtenido de *Streptococcus pyogenes*, indicó la presencia de proteínas extracelulares. La técnica de cromatografía utilizada permitió la obtención de la enzima pura lista para ser empleada como antígeno homogéneo en la detección de anticuerpos anti-DNasa B en pacientes con enfermedades estreptocócicas y postestreptococias. En el extracto puro, la concentración de proteínas totales disminuye por la extracción de las nucleasas A, C y D y otras proteínas liberadas extracelularmente que contribuyen al aumento de la concentración en el extracto crudo. La actividad enzimática medida por porcentajes de degradación del sustrato DNA- verde de metilo y por

el ensayo para la actividad de la DNasa I, mostró una relación con la concentración de proteínas totales.

DISCUSION

Los resultados mostraron que el protocolo aquí descrito puede ser más adecuado para el aislamiento de las nucleasas estreptocócicas y para su purificación que otros (7). El procedimiento es corto, los pasos realizados son pocos, por tanto, el riesgo de contaminación con microorganismos del medio ambiente se reduce. El corto tiempo del procedimiento, facilita la estabilidad del pH y las bajas temperaturas en las que se deben realizar todos los pasos evita la alteración de la enzima. La técnica de purificación cromatográfica, permitió la obtención de un extracto de la enzima DNasa B. La alta capacidad de separación de la matriz utilizada, DEAE-Sepharose-CL-6B, facilita la elusión de la DNasa B en forma rápida; también garantiza la elusión afectiva porque aumenta la especificidad en cuanto a la actividad enzimática se refiere, ya que, se anula la acción de las otras nucleasas (A, C y D). La concentración de proteínas totales de la fracción pura disminuye con relación al extracto crudo, debido a que este último contiene una mezcla heterogénea de nucleasa y otras proteínas extracelulares que se adhieren a la resina.

TABLA 1

ENZIMA	Proteínas Totales	Ensayo para la Actividad de la DNasa I	Porcentaje Degradación del DNA-Verde de Metilo
	MG/ML	Unidades Kunitz/ML	%
Control	1,0	40	88.37
Enzima cruda	8.75	30	91.8
Enzima pura			
Fracción No. 9	2.71	35	89.19
Fracción No. 10	3,07	17.5	90.81

SUMMARY

Streptococcal nuclease B is an extracellular product that is produced by a large number of strains of *Streptococcus pyogenes* and which elicits antibodies that have proved to be a useful index of streptococcal infection. The measurement of antistreptolysin O and antistreptococcal nuclease B (antideoxyribonuclease B) is a better criteria in the establishment of a diagnosis of streptococcal infection. An obstacle to this strategy in the past was the difficulty of preparing nuclease B antigen homogeneous with respect to its nuclease activity.

The present report details a further simplified procedure for isolation of nuclease B by ion exchange - on DEAE sepharose CL-6B, which facilitates the ready availability of this antigen.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferrieri P. Immune responses to streptococcal infections. Chapter 50 in Manual of Clinical Laboratory Immunology edited by Rose NR, Friedman H, Fahey JL pg 336. Am Soc Microbiol Washington D C 1986 Third Ed.
2. Stollerman GH. Rheumatic fever and streptococcal infection. Grune - Stratton. New York 1975.
3. Breese BB, Breese-Hall C. Beta hemolytic Streptococcal diseases. HMMD Boston 1978.
4. Klein GC, Jones W L. Comparison of the streptozyme test with the antistreptolysin "O" antideoxyribonuclease B and antihyaluronidase tests. Appl Microbiol 1977; 21: 257.
5. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Lewwis-Farr A, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265.
6. Klein GC, Baker CN, Addison BV et al. Microtest for streptococcal antigen - Stratton. New York New York 1975.
7. Selectha T, Gray ED. Isolation of streptococcal nuclease B by batch adsorption. J Clin Microbiol. 1975; 2: 528.