

Cromatografía de afinidad de la nitrato reductasa de *Ankistrodesmus braunii* utilizando Sefarosa-Azul Dextrano

M. A. de la Rosa, J. Díez y J. M. Vega *

Departamento de Bioquímica
Facultad de Biología y C.S.I.C.
Universidad de Sevilla
Sevilla (Spain)

(Recibido el 4 de septiembre de 1979)

M. A. DE LA ROSA, J. DIEZ and J. M. VEGA. *Affinity Chromatography of Ankistrodesmus braunii Nitrate Reductase Using Blue Dextran-Sepharose*. Rev. esp. Fisiol., 36, 177-182. 1980.

Blue Dextran has been coupled covalently to Sepharose-4B to purify the enzymatic complex NAD(P)H-nitrate reductase (EC 1.6.6.2.) from the green alga *Ankistrodesmus braunii* by affinity chromatography. The optimum conditions for the accomplishment of the chromatographic process have been determined.

The adsorption of nitrate reductase on Blue Dextran Sepharose is optimum when a phosphate buffer of low ionic strength and pH 6.5-7.0 is used. Once the enzyme has been bound to Blue Dextran Sepharose, it can be specifically eluted by addition of NADH and FAD to the washing buffer. However, none of the nucleotides added separately is able to promote the elution of the enzyme from the column. The elution can be also achieved, but not specifically, by increasing the ionic strength of the buffer with KCl.

These results have made possible a procedure for the purification of *A. braunii* nitrate reductase which led to electrophoretic homogeneity, with an overall yield of 70 % and a specific activity of 49 units/mg of protein.

El enzima NAD(P)H-nitrato reductasa (EC 1.6.6.2.) del alga verde *Ankistrodesmus braunii* cataliza la reducción asimilatoria de nitrato a nitrito con piridín-nucleótidos reducidos, NADH* o NADPH, como donador de electrones. Se trata de un complejo enzimático de alto peso molecular, 460.000 daltones (DE LA ROSA *et al.*, datos no publicados), que contiene FAD, molibdeno (16) y citocromo *b₅₅₇* (1, 4) como grupos prostéticos, y que po-

see dos mitades funcionales cuyas actividades pueden ensayarse independientemente: la primera, NAD(P)H-citocromo c reductasa, y la segunda, MVH-nitrato

Abreviaturas:

DTE	(ditioeritritol), 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano.
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético.
FAD	flavin adenín dinucleótido.
MVH	metil viológeno reducido.
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido reducido.
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido.
NAD(P)H	NADH o NADPH.

* Correspondencia: Dr. J. M. Vega. Facultad de Biología y C.S.I.C. Avda. de la Reina Mercedes, s/n. Sevilla.

reductasa. La reducción de nitrato con NAD(P)H requiere el funcionamiento de las dos mitades del complejo, actuando secuencialmente en el orden indicado.

Aunque la nitrato reductasa de *A. braunii* había sido purificada anteriormente por un método basado en técnicas convencionales (1), la baja actividad específica conseguida, 0,6 unidades/mg de proteína, con un factor de purificación de sólo 30 veces y una recuperación del 30 % respecto al extracto crudo, indujo a intentar otros métodos más efectivos de purificación. Por otra parte, el éxito conseguido al aplicar la cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano a la purificación de nitrato reductasa de otros orígenes (2, 5, 10, 13), incitó a usar esta misma técnica como etapa básica para la purificación del enzima de *A. braunii*.

En el presente trabajo se describen en detalle las condiciones óptimas para purificar por cromatografía de afinidad la nitrato reductasa de *A. braunii*, así como las principales características del comportamiento del enzima durante el proceso cromatográfico.

Material y métodos

El alga verde *Ankistrodesmus braunii*, estirpe 202-7c procedente de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen, se cultivó a 25° C en la luz, utilizando NO_3K 8 mM como fuente de nitrógeno, según se ha descrito previamente (6). Los cultivos se burbujearon con una corriente de CO_2 al 5 % en aire. Después de 3 días de crecimiento se recogieron las células por centrifugación a baja velocidad y se rompieron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm de diámetro en un homogenizador Bühler (15). El material roto se extrajo con el tampón estándar, 10 mM de fosfato potásico, pH 7,0, conteniendo DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20 μM , y se filtró a través de 4 capas de gasa para retener las perlas de vidrio. El homogeneizado resultante se centrifugó a

27.000 $\times g$ durante 15 min, y al sobrenadante —extracto crudo libre de células— se añadió, gota a gota y con agitación continua, una disolución de sulfato de estreptomycin (73 mg/ml, pH 7,0) en la proporción de 1 ml por cada 10 ml de extracto. Después de 10 min a 0° C, se centrifugó la suspensión a 20.000 $\times g$ durante 15 min, y se recogió el sobrenadante como material de partida para llevar a cabo la cromatografía de afinidad.

La actividad NAD(P)H-nitrato reductasa se determinó colorimétricamente midiendo el nitrito formado por reducción del nitrato. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μmol de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 10 μmol de NO_3K ; 0,3 μmol de NAD(P)H; y una cantidad adecuada de enzima. Después de incubar a 30° C durante 5 min, se determinó el nitrito formado por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según la técnica propuesta por SNELL y SNELL (12). La actividad MVH-nitrato reductasa se determinó de forma similar a la anterior, excepto que en este caso se usó como donador de electrones 0,15 μmol de metil viológeno reducido con 0,8 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de nitrito por min. La proteína se determinó por el método de LOWRY (9).

El procedimiento seguido para la preparación de la Sefarosa-Azul Dextrano fue análogo al descrito por CUATRECASAS (3). 1 g de Sefarosa-4B activada con BrCN se lavó con 200 ml de agua destilada mediante filtración en vacío. La resina lavada se suspendió inmediatamente en 7 ml de tampón $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0,4 M, pH 10, conteniendo 100 mg de Azul Dextrano. La suspensión se agitó lentamente durante 18 h a 4° C para dar lugar a la reacción de acoplamiento del ligando a la matriz. A continuación se lavó varias veces con KCl 1 M para eliminar el exceso de Azul Dextrano, así como con una solución de glicina para bloquear los gru-

pos activos de la matriz que no habían acoplado el Azul Dextrano. Por último, la resina de Sefarosa-Azul Dextrano se empaquetó, según los casos, en una columna de $7,5 \times 55$ mm (con objeto de poner a punto los métodos de adsorción y elución) o en una columna de 17×65 mm (para purificar mayores cantidades de enzima).

Resultados y discusión

La adsorción de la nitrato reductasa de *A. braunii* por la Sefarosa-Azul Dextrano es óptima a pH 6,5-7,0. A pH 7,5 aproximadamente un 30 % de la actividad total no se adsorbe, mientras que a pH 8,0 no se retiene nada de enzima en la columna (fig. 1). De acuerdo con estos datos se eligió como óptimo el pH de 7,0 para llevar a cabo el proceso cromatográfico.

En relación con la naturaleza del tampón a utilizar se escogió el fosfato como más adecuado por presentar un alto poder amortiguador en la zona próxima a pH 7,0 y ventajas muy significativas respecto a otros compuestos ensayados. Se han comparado tampones de fosfato y de Tris-ClH en condiciones semejantes de pH y fuerza iónica, pudiéndose comprobar que la adsorción de la nitrato reductasa por la Sefarosa-Azul Dextrano es sensiblemente mejor en fosfato que en Tris-ClH. Por otra parte, la interacción entre el enzima y la Sefarosa-Azul Dextrano disminuye notablemente cuando se aumenta la fuerza iónica del tampón, de modo que el enzima queda sólo parcialmente adsorbido en la columna cuando se utilizan tampones de fosfato de concentración 0,05 M o superior.

El FAD, cofactor fisiológico del enzima, es un efectivo protector de la actividad diaforasa del complejo enzimático nitrato reductasa de algas verdes (15). Por otro lado, el DTE protege los grupos sulfhidrilos del enzima y el EDTA impide la acción desnaturante de metales. Por

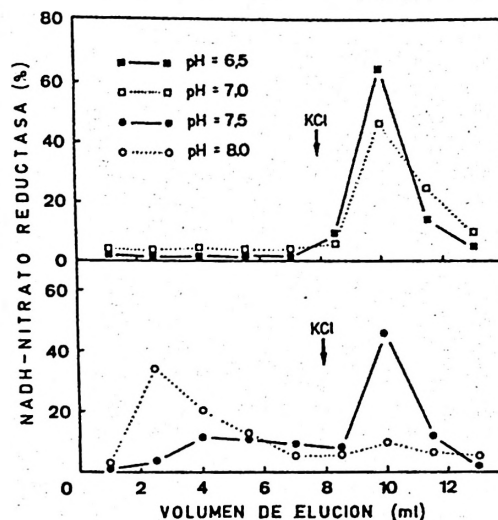


Fig. 1. Efecto del pH sobre la adsorción de la nitrato reductasa por la Sefarosa-Azul Dextrano.

Cuatro preparaciones de nitrato reductasa, obtenidas según se describe en Materiales y métodos y en tampón A (con FAD) del pH indicado en la figura, se pasaron por una columna de Sefarosa-Azul Dextrano; a continuación se aplicó una disolución de KCl 1 M preparada en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, y se expresó la actividad de cada fracción en tanto por ciento, considerando el 100 % de actividad la suma de las actividades de todas las fracciones recolectadas en cada caso.

tanto, al complementar el tampón con estos compuestos, se minimizan las pérdidas de actividad durante la adsorción del enzima por la Sefarosa-Azul Dextrano. En conclusión, el tampón principalmente utilizado fue fosfato potásico 10 mM, pH 7,0, conteniendo DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20 μ M (tampón A). En algunos experimentos se usó también el mismo tampón pero sin FAD (tampón B).

Una vez adsorbida la nitrato reductasa por la columna de Sefarosa-Azul Dextrano, se procede al lavado con los tampones A o B, utilizando un volumen aproximadamente 10 veces superior al de ex-

clusión de la columna, con lo que se elimina gran cantidad de proteínas no adsorbidas por el Azul Dextrano. La nitrato reductasa se eluye posteriormente aumentando la fuerza iónica del tampón por aplicación de un gradiente lineal de KCl de 0 a 2 M (fig. 2). No obstante, la desestabilización de la unión de la nitrato reductasa a la Sefarosa-Azul Dextrano, y por tanto la elución del enzima, puede conseguirse de una forma más específica por la acción combinada de NADH, sustrato fisiológico del enzima, más FAD, uno de sus grupos prostéticos (fig. 3). Conviene subrayar que la elución del enzima no tiene lugar si la disolución de NADH se prepara en tampón B (sin FAD), según indica la figura 3. Ello demuestra el interesante efecto cooperativo que ejercen el NADH y el FAD sobre el enzima, provocando la disociación de la nitrato reductasa del Azul Dextrano y su consiguiente elución. Es importante señalar aquí que, una vez eluida la nitrato reductasa de la columna por la acción combinada de NADH y FAD, la posterior aplicación de KCl 1 M eluye el resto

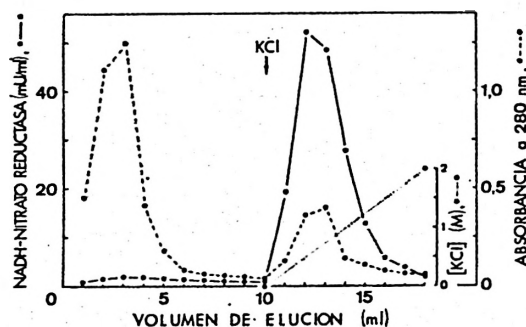


Fig. 2. Perfil de elución de proteína y actividad nitrato reductasa adsorbida a una columna de Sefarosa-Azul Dextrano.

Una disolución de nitrato reductasa, obtenida según se indica en Materiales y métodos, se pasó por una columna de Sefarosa-Azul Dextrano. La columna se lavó con el tampón A y, donde indica la flecha, se aplicó un gradiente de KCl desde 0 hasta 2 M en el mismo tampón.

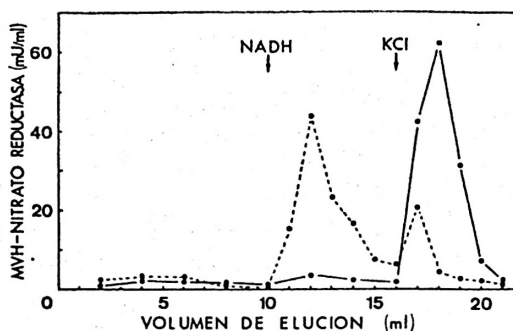


Fig. 3. Perfil de elución con NADH más FAD o con KCl de la nitrato reductasa adsorbida a una columna de Sefarosa-Azul Dextrano.

Dos disoluciones de nitrato reductasa, obtenidas según se describe en Materiales y métodos, una en tampón A (con FAD, ●—●) y otra en tampón B (sin FAD, ●—●), se aplicaron a una columna de Sefarosa-Azul Dextrano. La columna se lavó con el tampón correspondiente en cada caso y donde se indica se suplementó con NADH 0,5 mM o con KCl 1 M.

del enzima retenido en la columna (fig. 3), si bien con una actividad específica mucho más baja debido a que la cantidad de proteína que fluye en este caso es mayor que cuando se utilizan los nucleótidos como eluyentes. Es pues evidente que la elución con nucleótidos es prácticamente específica para la nitrato reductasa, permitiendo obtener preparaciones altamente purificadas del enzima, mientras que la elución con fuerza iónica promueve además la salida de otras proteínas contaminantes.

Aunque se ha purificado la nitrato reductasa de varios organismos usando la cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano (2, 5, 10, 13), hay algunas interesantes diferencias en el comportamiento de estos enzimas durante el desarrollo del proceso cromatográfico. Así, el enzima de *Chlorella vulgaris* (13) queda retenido en la Sefarosa-Azul Dextrano incluso cuando se lava la columna con 0,4 M de tampón fosfato, pero se eluye

con concentraciones μM de NADH. Por el contrario, en presencia de fosfato 0,4 M sólo el 30-40 % de la nitrato reductasa de espinaca queda adsorbida (10) y, aunque la aplicación posterior de un gradiente de NADH es inefectiva, se consigue la elución con un gradiente lineal de KCl de 0 a 3 M (10). La nitrato reductasa de *A. braunii* es muy susceptible a la elución por tampón de alta fuerza iónica, quedando sólo parcialmente retenida cuando el tampón de fosfato es 0,05 M. Por otra parte, la elución específica con NADH del enzima de *A. braunii* requiere la presencia de FAD en el tampón de elución (fig. 3). En consecuencia, parece plausible pensar que la nitrato reductasa de espinaca se eluiría también con NADH si el tampón se suplementase con FAD.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para llevar a cabo la cromatografía de afinidad de la nitrato reductasa de *A. braunii* en Sefarosa-Azul Dextrano, fue posible poner a punto un método para la purificación de dicho enzima. El proceso incluye como etapas principales (4): tratamiento con sulfato de estreptomycin y cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano, efectuándose la elución específica del enzima con un gradiente de NADH de 0 a 1 mM en tampón A. El método de purificación permite conseguir preparaciones altamente purificadas del enzima, con una actividad específica de 49 unidades/mg de proteína, un factor de purificación de 1.200 veces y una recuperación global del 70 %. Obviamente, estos resultados son notablemente superiores a los hasta ahora descritos para este enzima, a saber 0,6 unidades/mg, con una recuperación del 30 % y una purificación de 30 veces (1).

La nitrato reductasa purificada resultó ser homogénea, ya que en electroforesis analítica en gel de poliacrilamida se observó una sola banda de proteína que presentaba reacción positiva para la tinción en el gel de la actividad MVH-nitrato re-

ductasa (DE LA ROSA *et al.*, datos no publicados).

La cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano ha sido utilizada previamente para la purificación de varias nitrato reductasas (2, 5, 10, 13) y de otros enzimas, tales como fosfofructoquinasa (7), lactato deshidrogenasa (11), malato deshidrogenasa (8), etc. THOMPSON *et al.* (14) han propuesto que el grupo cromóforo del Azul Dextrano es específico para un determinado tipo de estructura llamada «pliegue dinucleotídico». Después de examinar la interacción con el Azul Dextrano de una gran cantidad de proteínas conocidas por poseer el pliegue dinucleotídico, así como de otras que no lo poseen, concluyeron que la cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano puede utilizarse para identificar fácilmente a aquellas proteínas que poseen dicho pliegue (14). Por tanto, los resultados presentados en este trabajo indican claramente que la NAD(P)H-nitrato reductasa de *A. braunii* también posee el pliegue dinucleotídico, el cual probablemente corresponde al sitio activo del enzima para la unión del NAD(P)H, su sustrato fisiológico.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Prof. M. Losada su constante estímulo y labor crítica.

Este trabajo ha sido subvencionado por Philips Research Laboratories (Holanda), the National Science Foundation (U.S.A.) y la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (España).

Resumen

El azul dextrano, covalentemente acoplado a la Sefarosa-4B, se ha empleado para purificar el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa (EC 1.6.6.2.) del alga verde *Ankistrodesmus braunii* por cromatografía de afinidad. Se han determinado las condiciones más favorables para la realización del proceso cromatográfico.

La adsorción de la nitrato reductasa por la

sefarosa-azul dextrano es óptima cuando se utiliza un tampón de fosfato de baja fuerza iónica y de pH 6,5-7,0. Una vez adsorbido el enzima por la sefarosa-azul dextrano, la elución tiene lugar específicamente por la adición de NADH y FAD al tampón de lavado; no obstante, ninguno de los dos nucleótidos por separado es capaz de promover la desadsorción del enzima. Por otra parte, la elución puede también conseguirse, aunque no específicamente, aumentando la fuerza iónica del tampón con KCl.

Estos resultados han supuesto la base de partida para purificar hasta homogeneidad electroforética la nitrato reductasa de *A. braunii*, con una recuperación final del 70 % y una actividad específica de 49 unidades/mg de proteína.

Bibliografía

1. AHMED, J. y SPILLER, H.: *Plant Cell Physiol.*, 17, 1-10, 1976.
2. CAMPBELL, W. H.: *Plant Sci. Lett.*, 7, 239-247, 1976.
3. CUATRECASAS, P.: *J. Biol. Chem.*, 245, 3059-3065, 1970.
4. DÍEZ, J.: Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 1978.
5. GUERRERO, M. G. y GUTIÉRREZ, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 482, 272-285, 1977.
6. KESSLER, E., LANGNER, W., LUDEWIG, I. y WIECHMANN, H.: En «Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria», Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, 1963, pp. 7-20.
7. KOPPERSCHLÄGER, G., DIEZEL, W., FREYER, R., LIEBE, S. y HOFFMANN, E.: *Eur. J. Biochem.*, 22, 40-45, 1971.
8. KUAN, K. N. y VESTLING, C. S.: *Fed. Proc.* 34, Abstr. 2633, 682, 1975.
9. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, M. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
10. NOTTON, B. A., FIDO, R. J. y HEWITT, E. J.: *Plant Sci. Lett.*, 8, 165-170, 1977.
11. RYAN, L. D. y VESTLING, C. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 279-284, 1974.
12. SNELL, F. D. y SNELL, C. T.: «Colorimetric Methods of Analysis», 3rd. ed., D. Van Nostrand Company, Nueva York, 1949, p. 804.
13. SOLOMONSON, L. P.: *Plant Physiol.*, 56, 853-855, 1975.
14. THOMPSON, S. T., CASS, K. H. y STELLWAGEN, E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 669-672, 1975.
15. ZUMFT, W. G., APARICIO, P. J., PANACHE, A. y LOSADA, M.: *FEBS Letters*, 9, 157-160, 1970.
16. ZUMFT, W. G., SPILLER, H. y YEBOAH-SMITH, I.: *Planta*, 102, 228-236, 1972.