

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona

Inducción de ribonucleasas en hongos. II. Purificación de ribonucleasa de *Pleospora**

por

C. M. Cuchillo **, J. M. Ventura, E. Concustell y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 11 de febrero de 1967)

Las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento fúngico de *Pleospora* en soluciones nutritivas compuestas exclusivamente por RNA amortiguado, han sido ya definidas (4, 5). Igualmente se presentaron los datos concernientes a la inducción de ribonucleasa referidos a las condiciones variables de cultivo descritas.

Existe abundante bibliografía sobre purificación de RNasa de páncreas de buey (9, 10, 11, 12, 15) así como de RNasas obtenidas de otras fuentes (6, 8, 14, 18, 19).

Para la purificación de la Ribonucleasa de *Pleospora* se han utilizado cultivos de 15 días de duración realizados en un fermentador de 20 litros de capacidad.

Material y métodos

MEDIO DE CULTIVO. Como tal se ha utilizado una suspensión de RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos 0,025 M, pH 6,5.

MEDIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁ-

TICA. Para la determinación de la actividad enzimática se ha utilizado el procedimiento de TANAKA (18), definiéndose como unidad de actividad ribonucleásica la que produce un aumento de 0,1 unidades de D. O. a 260 m μ en las condiciones utilizadas.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. En los distintos pasos de la purificación se han determinado las proteínas por el método de LOWRY y por mediación de la densidad óptica a 280 m μ después de la cromatografía.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA. Para la realización de la misma se ha utilizado DEAE-celulosa (Serva, Heidelberg) en una columna de 1,2 x 15 cm realizándose por el sistema de elución fraccionada (*stepwise*). Los efluentes de la columna se han recogido en un colector de frac-

* Con una ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación Nacional.

** Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación. Dirección actual: Department of Biochemistry. University College, London, Gower St. W.C.1.

ciones regulado a un volumen constante de 9 ml por fracción.

ULTRACENTRIFUGACIÓN. La ultracentrifugación se ha llevado a cabo en una ultracentrífuga preparativa Beckman Spinco L₂ regulada a 5° C.

PURIFICACIÓN DE RIBONUCLEASA. La ribonucleasa endocelular se extrae en la forma descrita en comunicación anterior, disolviéndose en la mínima cantidad de líquido, el cual se somete a la ultracentrífuga a 105.000 × g durante dos horas a 5° C. Se decanta el sobrenadante sobre el que se efectúa seguidamente un fraccionamiento con sulfato amónico a 20, 40, 60, 80 y 100 % de saturación (tabla I).

Los precipitados obtenidos se separan por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos y se disuelven en la

mínima cantidad de agua destilada dializándose a continuación durante 24 horas a 5° C contra agua destilada.

El dializado procedente de la fracción precipitada entre 40 y 60 % de saturación (F-3) se somete a una nueva precipitación mediante la adición de dos volúmenes de alcohol absoluto, recogién-dose el precipitado por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos, lavándose en la mínima cantidad de amortiguador acetato 0,1 M, pH 4,0 y se somete a una cromatografía sobre una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se lleva a cabo mediante un lavado con 270 ml del mismo amortiguador, eluyéndose después con 500 ml de ClNa 0,06 M en acetato 0,1 M, pH 4,0. En la figura 1 se muestra el cro-

TABLA I

Distribución de la actividad RNásica de *Pleospora* en el fraccionamiento con sulfato amónico*.

Saturación %	Volumen	Conc. unid./ml	Total unidades	Proteínas mg/ml	Act. esp. unid./mg
20 (F-1)	50 ml	3,61	180,5	0,77	4,68
40 (F-2)	50 ml	4,50	225,0	0,90	5,00
60 (F-3)	50 ml	27,50	1375,0	0,93	29,37
80 (F-4)	50 ml	3,66	183,0	0,35	10,45
100 (F-5)	40 ml	1,75	70,0	0,25	7,00

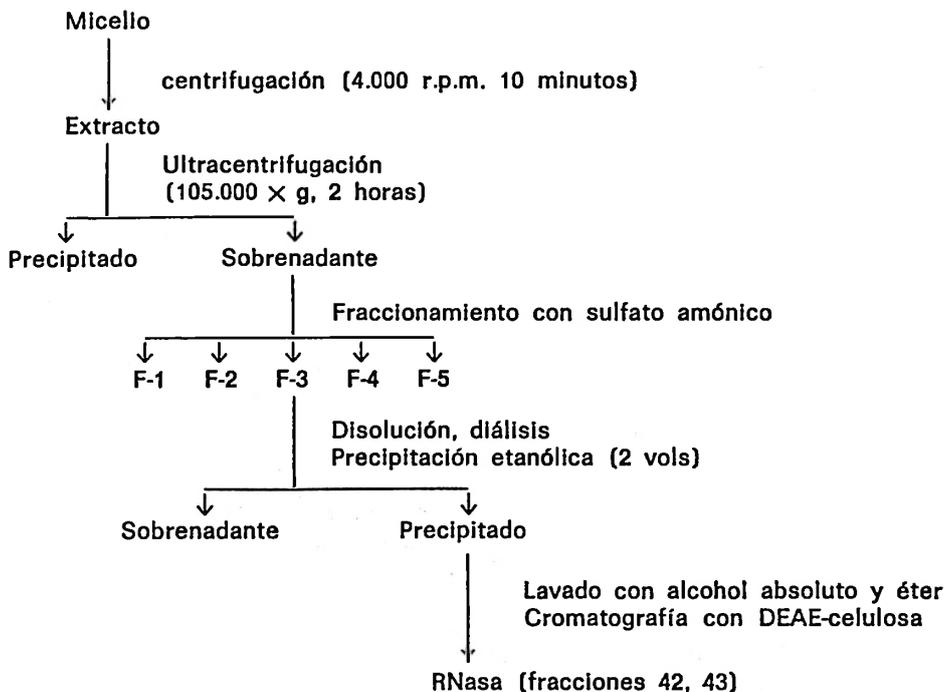
(*) Fraccionamiento realizado con el sobrenadante de extracto de micelio centrifugado a 105.000 × g durante 2 horas (ver Tabla II).

TABLA II

Purificación de ribonucleasa de *Pleospora*

Operación	Volumen ml	Conc. unid./ml	Total unidades	Proteína mg/ml	Act. esp. unid./ml	Rend. %	Purif.
Extracto inicial. . .	300	11,00	3300,0	1,20	9,16	100,00	1,00
Sobrenadante (ultra-centrifugado. . .	275	11,45	3148,0	0,75	15,26	95,30	1,66
Fraccionamiento Sulf. amon. (F-3) . . .	50	27,50	1375,0	0,93	29,57	41,66	3,22
Precipitación c. etanol.	25	40,30	1007,0	1,25	32,24	30,51	3,52
Cromatografía . . .	18	5,20	93,6	0,40	130,00	2,83	14,19

ESQUEMA I

Esquema del proceso seguido para la purificación de RNasa de *Pleospora*.

matograma obtenido. En el esquema I se señalan los pasos realizados y en la tabla II los resultados del proceso de purificación.

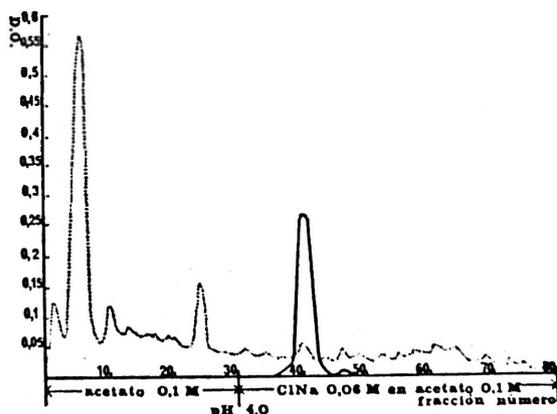


FIG. 1. Purificación cromatográfica de la ribonucleasa de *Pleospora*. Proteínas totales. Actividad ribonucleásica.

Discusión

Dada la actual importancia de las ribonucleasas como piezas fundamentales tanto en el avance de la Enzimología, como en la dilucidación de la estructura de los ácidos ribonucleicos se ha considerado importante el estudio de algunas características de la ribonucleasa de *Pleospora* previa purificación de la misma.

En la mayoría de los procesos de purificación de ribonucleasas descritos se utiliza el fraccionamiento con sulfato amónico y la cromatografía en columna. Ambos procesos se han utilizado para la purificación de la ribonucleasa de *Pleospora* tras previa ultracentrifugación del homogenado obtenido en la extracción del enzima contenido en el interior de las células fúngicas.

La aplicación de la ultracentrífuga en una primera etapa de purificación ha demostrado ser de gran utilidad proporcionando una solución completamente libre de elementos formales y disminuyendo casi a la mitad el material proteico original, obteniéndose al mismo tiempo una actividad mejor delimitada.

La RNasa de *Pleospora* precipita a una concentración de sulfato amónico comprendida entre el 40 y el 60 % de saturación. El motivo de que el aumento en la purificación sea relativamente bajo se explica porque la mayoría de las proteínas precipitables a 20 y 40 % de saturación por su tamaño molecular han sido eliminadas en el proceso de ultracentrifugación. El bajo rendimiento obtenido es posiblemente debido a una diálisis parcial de la RNasa a través de la membrana semipermeable, tal como ocurre, por ejemplo, con la RNasa pancreática (1).

Se ha descrito la purificación cromatográfica de diferentes RNasas utilizando gran número de adsorbentes: CM-celulosas (2, 6, 14, 15, 16), resinas del tipo IRC-50 (3, 6, 9), Sephadex G-75 y Sulfoetilsphadex (3) y DEAE-celulosa (8, 13, 14, 17, 18).

La utilización de DEAE-celulosa en las mismas condiciones empleadas por TANAKA (18) para la purificación de RNasa de *Streptomyces erytherus*, proporciona un pico de actividad bien delimitado aunque el rendimiento ha sido bajo. Esto puede ser debido al pH de la solución eluyente, 4,0, muy desviado del de óptima actividad del enzima.

La precipitación con alcohol y posterior lavado con alcohol absoluto y éter se ha utilizado con el fin de obtener un volumen adecuado para la posterior cromatografía, evitando de este modo la concentración a presión reducida, la cual puede producir pérdidas en la actividad enzimática (7).

Resumen

La RNasa obtenida por inducción en cultivos de *Pleospora* se ha purificado 14 veces, mediante la aplicación de la ultracentrifugación, fraccionamiento con sulfato amónico, precipitación alcohólica y cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Summary

Induction of ribonucleases in fungi.
II. Purification of ribonucleases of *Pleospora*.

RNase obtained by induction from cultures of *Pleospora* was purified about 14 times by means of ultracentrifugation, ammonium sulfate, and precipitation with ethanol followed by DEAE-cellulose chromatography.

Bibliografía

1. ANFENSEN, C. S. and WHITE, J. : *The Enzymes*, 4, Academic Press, 1961.
2. AQUIST, S. E. G. and ANFENSEN, C. B. : *J. Biol. Chem.*, 234, 1112, 1959.
3. CRESTFIELD, A. M., STEIN, W. H. and MOORE, S. : *J. Biol. Chem.*, 238, 618, 1963.
4. CUCHILLO, C. M., CONCUSTELL, E. y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, 22, 19, 1966.
5. CUCHILLO, C. M., CONCUSTELL, E. y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, 23, 1967.
6. DELANEY, R. : *Biochemistry*, 2, 438, 1963.
7. DIXON, M. and WEBB, E. C. : *Enzymes*, 2.^a edic., Longmans, Londres, 1964.
8. EGAMI, F., TAKAHASHI, K. and OCHIDA, T. : en Davidson, J. N. and COLIN, W. E. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, III, Academic Press, Nueva York, 1964.
9. HIRS, C. H. W. : *J. Biol. Chem.*, 219, 611, 1956.
10. KUNITZ, M. : *J. Gen. Physiol.*, 24, 15, 1940.
11. MARTÍN, M. : Tesis doctoral, Barcelona, 1961.

12. McDONALD, M. R. : *Methods in Enzymology*, II, 427, Academic Press, 1955.
13. NEU, H. C., and HEPPEL, L. A. : *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 14, 109, 1964.
14. RUSHIZKY, G. W., GRECO, A. E., HARTLEY, Jr., R. W., and SOBER, H. A. : *Biochemistry*, 2, 787, 1963.
15. SHAPIRA, R. : *Anal. Biochem.*, 4, 322, 1962.
16. TABORSKY, G. : *J. Biol. Chem.*, 234, 2652, 1959.
17. TAKAHASHI, K. : *J. Biochem.*, 51, 95, 19...
18. TANAKA, K. : *J. Biochem.*, 50, 62, 1961.
19. YONEDA, M. : *J. Biochem.*, 55, 469, 1964.

