

Expresión heteróloga de la proteína OmpU de *Vibrio cholerae* y su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados

Alina Falero, Edith Suzarte, Belinda Águila, Javier Campos y Rafael Fando.

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: alina.falero@cnic.edu.cu, edith.suzarte@cnic.edu.cu

Recibido: 20 de junio de 2007.

Aceptado: 26 de octubre de 2007.

Palabras clave: cromatografía de afinidad, *Vibrio cholerae*, OmpU, purificación.
Key words: affinity chromatography, *Vibrio cholerae*, OmpU, purification.

RESUMEN. OmpU es una proteína integral de membrana de la familia de las porinas que se ubica en la envoltura externa de las bacterias del género *Vibrio*. Este manuscrito describe la obtención de un plásmido recombinante para expresar la proteína OmpU fusionada a un dominio c-terminal myc-hexahistidina (myc-hexa-his) de 2 kDa. La proteína recombinante resultante OmpU-myc-hexa-his codificada en el plásmido se expresa en la cepa *Escherichia coli* Top 10, acumulándose en forma insoluble en el interior celular. La recuperación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión insolubles se realiza en urea 7 mol/L. La forma desnaturalizada se purificó por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. El análisis por SDS-PAGE de las fracciones purificadas detectó una proteína de aproximadamente 40 kDa, en correspondencia con la masa molecular reportada para el monómero natural de OmpU (38 kDa) en *Vibrio cholerae* y el dominio c-terminal acoplado. La proteína recombinante obtenida reaccionó en inmunoblot con los anticuerpos monoclonales anti-OmpU y anti-hexa-his. La detección de la misma banda con estos dos anticuerpos indica la coexistencia de la proteína OmpU y el epitopo hexa-histidina en una misma especie. En las condiciones de estudio empleadas, la proteína se obtuvo en un solo paso cromatográfico, resultado del cual el grado de pureza se incrementó hasta el 90 %; con un rendimiento del 23 %. Se dispone ahora del sistema vector hospedero necesario para expresar la proteína.

ABSTRACT. OmpU is an integral outer membrane protein belonging to the porine family, which is present in the outer membrane of bacteria of the genus *Vibrio*. This manuscript describes the construction of a recombinant plasmid coding for OmpU protein fused to a myc-hexa-histidine domain (myc-hexa-his) of 2 kDa. The plasmid encoded recombinant protein OmpU-myc-hexa-his, is expressed at high levels in the *E. coli* Top 10 strain, which is accumulated insoluble in inclusion bodies inside the cell. The recombinant protein is recovered in 7 mol/L urea from insoluble inclusion bodies. The denatured form was purified by immobilized metal-chelate affinity chromatography. SDS-PAGE analysis of the purified fractions detected a band of approximately 40 kDa, which is in correspondence with the molecular mass reported for the wild type monomer of OmpU (38 kDa) in *Vibrio cholerae* strains coupled to the recombinant c-myc-hexa-his domain. The recombinant protein reacted with anti-OmpU and anti-hexa-his monoclonal antibodies in western blotting. The detection of comigrating bands with these two antibodies indicates the presence of OmpU protein fused to hexa-histidine tag in the same peptide. The protocol described allowed obtaining this protein in a single chromatographic step and increased the purity up to 90 %, yielding on average a 23 % of the initial amount. Consequently, a host-vector system is available to express this protein.

INTRODUCCIÓN

OmpU es una proteína integral de membrana de la envoltura externa de la bacteria *Vibrio cholerae*, agente causal del cólera en los humanos.¹ Pertenece a la familia de las porinas y constituye el 30 % del contenido proteico de la membrana externa de los *vibriónes* de esta especie. El crecimiento microbiano en ausencia de sales puede exacerbar su contenido hasta un 60 %.² OmpU se asocia y forma trímeros en la bicapa lipídica; el poro o canal formado entre los monómeros tiene permeabilidad selectiva para la entrada y salida de moléculas hidrofílicas de talla molecular menor que 600 Da. En el género *Vibrio* las

porinas de membrana externa funcionan como canales para el transporte de hierro, fosfato, azúcares y para la adherencia a superficies abióticas.³

La estructura trimérica de membrana de OmpU es termolábil a 100 °C en presencia de dodecilsulfato de sodio se disocia la estructura y desnaturalizan los monómeros peptídicos de masa molecular aparente igual a 38 kDa.^{2,3} La migración electroforética relativa de estos péptidos se modifica por la temperatura de solubilización.²⁻⁵ En *Vibrio cholerae* la expresión del gen *ompU* está sujeta a regulación positiva por el activador transcripcional transmembrana ToxR, el cual controla también la expresión de determinantes de la virulencia bacteriana como la toxina

colérica y la pilina de expresión corregulada con la toxina colérica (TCP). Ello sugiere que OmpU podría contribuir a la patogénesis del cólera. Las propiedades adhesivas de OmpU a las células epiteliales, demostradas *in vitro*, no son esenciales para la colonización intestinal de *Vibrio cholerae in vivo* en ratones lactantes.⁶ Sin embargo, no hay informes de evaluación de la capacidad colonizadora en humanos de mutantes ompU. La proteína OmpU está involucrada en la resistencia a la bilis y a los detergentes aniónicos y en la respuesta del microorganismo para tolerar los ácidos orgánicos de cadena corta y resistir la acción de los péptidos microbicidas de origen intestinal.^{7,8} La investigación básica fundamental de las funciones de OmpU es de gran interés, así como su posible implicación en la virulencia y en la sobrevivencia intestinal. Se justifica trabajar en la obtención de una construcción genética que permita expresar la proteína a niveles que faciliten su posterior purificación.

El vector pBAD/Myc-His (Invitrogene) es un plásmido útil para la expresión controlada y abundante de proteínas en *Escherichia coli* y en *Vibrio cholerae*. El promotor araBAD (P_{BAD}) presente en este plásmido funciona eficientemente en ambas especies solo en presencia de arabinosa. Este plásmido codifica además para la proteína reguladora AraC que fortalece la regulación de los genes controlados por P_{BAD} .⁹ Por otra parte, el sistema pBAD/Myc-His permite crear una fusión génica entre el gen de interés y el epitopo myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Asp-Leu) unido a un brazo espaciador (Asn-Ser-Ala-Val-Asp) y una cola de seis histidinas (-His₆) por el extremo 3' del gen de interés. Ello facilita la purificación de la proteína recombinante resultante empleando la cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. Se justifica evaluar si este vector es útil para clonar y sobreexpresar la proteína OmpU en *Escherichia coli*.

La sobreexpresión de las proteínas en un hospedero bacteriano puede traer como consecuencia su insolubilización en el interior celular a causa de la agregación y formación de cuerpos de inclusión citoplasmáticos. La formación de cuerpos de inclusión está influenciada por la naturaleza de la proteína, el hospedero y el nivel de expresión, que resulta a su vez de la selección del vector y las condiciones de inducción y crecimiento.¹⁰

En el caso de OmpU, proteína integral de membrana de naturaleza hidrofóbica, cabe esperar una tendencia incrementada a la agregación. La mayoría de las proteínas de los cuerpos de inclusión se solubilizan empleando detergentes o agentes caotrópicos como la urea 6 a 8 mol/L o el hidrócloruro de guanidina 6 mol/L, previo a su purificación. La obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión limita la utilidad de los procedimientos de purificación estándar que requieren condiciones no desnaturizantes. Sin embargo, la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados puede realizarse bajo condiciones desnaturizantes.

El presente manuscrito describe el trabajo realizado con el objetivo de obtener un sistema vector-hospedero para expresar la proteína OmpU controlada por un promotor inducible por arabinosa, así como la posterior producción a escala de laboratorio y la purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. Este constituye el primer paso de un trabajo dirigido a utilizar este sistema y esta proteína para la obtención de anticuerpos monoclonales y la realización de estudios posteriores de estructura-función, que aporten nuevos elementos, dirigidos a esclarecer el papel de OmpU en la inmunopatogénesis de *V. cholerae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas de trabajo con ADN

El ADN plasmídico se purificó con el sistema Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa acorde con Sambrook y col.¹¹ La purificación de fragmentos de ADN a partir de ellos, se realizó con el sistema GFX[™] PCR DNA and gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech). La transformación bacteriana se realizó mediante electroporación, según Dower y col.¹²

Construcciones plasmídicas

El ADN de la cepa de *V. cholerae* N16961 se usó como molde para amplificar el gen ompU utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se compraron al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología con las secuencias siguientes: oligo de ompU directo (ompU5')- 5'-CAT GCC ATG GAC AAT AAA TTA GG-3', oligo de ompU reverso (ompU3')-5'- TTA AGA TCT GTC GTA ACG TAG ACC G-3'. La PCR se hizo con la polimerasa Pfu y a una temperatura de hibridación de 48 °C en los cinco primeros ciclos y 57 °C en los veinte ciclos restantes. En todos los casos, se realizó la desnaturización a 94 °C y la extensión a 72 °C.

El ADN amplificado del gen ompU se ligó al vector pUC19 cortado con *EcoRI* y tratado con T4 ADN polimerasa. El plásmido resultante se cortó con las enzimas *NcoI* y *SacI*. El inserto escindido, codificante del gen ompU, se ligó al vector de expresión pBAD/Myc-His (Invitrogene)⁹ digerido con las mismas enzimas, lo cual lo situó cuesta abajo del promotor P_{BAD} . El plásmido resultante se digirió con la enzima *Bgl II* y se religó para eliminar el codón de parada natural del gen y dejarle acoplado por el extremo c-terminal el dominio Myc-hexa-his.

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa *Escherichia coli* Top 10 (mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ(*araA*leu)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*) transformada con el plásmido de expresión se usó como hospedero heterólogo productor de la proteína recombinante OmpU-myc-hexa-his. Esta cepa se cultivó en 5 mL de caldo LBA (NaCl, 10 g · L⁻¹; triptona, 10 g · L⁻¹; extracto de levadura, 5 g · L⁻¹ y ampicilina, 100 mg · mL⁻¹) en una zaranda orbital termostataada (Newbrunswick, USA) durante toda una noche a 37 °C a 200 r/min. Un mililitro del cultivo se transfirió a 300 mL de caldo LBA y se cultivó en zaranda en iguales condiciones hasta alcanzar 0,5 unidades de densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm. La expresión de OmpU se indujo a continuación por adición de arabinosa a una concentración de 0,002 % (p/v) e incubación en zaranda orbital por 4 h adicionales a 200 r/m y 37 °C.

Cosecha de la biomasa

La biomasa del cultivo fue sedimentada por centrifugación durante 10 min a 6 000g y a 4 °C; el sobrenadante se desechó y el sedimento celular se lavó con disolución estabilizadora de fosfato de sodio 50 mmol/L; pH 8,0 (Na₂HPO₄, 50 mmol/L; NaCl, 1 mol/L; ajustado a pH 8,0 con NaH₂PO₄).

Obtención del lisado celular total

La biomasa de 300 mL de cultivo se resuspendió en 15 mL de disolución estabilizadora de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 8,0. La suspensión se sometió a cinco ciclos de 30 s de exposición cada uno, en un desintegrador

ultrasónico MEGATON, seguido de 15 s de incubación en baño de hielo. El proceso subsiguiente se realizó a 4 °C. El extracto crudo se centrifugó durante 15 min a 9 000g y el sedimento insoluble se lavó dos veces, cada vez con 30 mL de la misma disolución estabilizadora.

Fracionamiento para enriquecer el contenido de OmpU en el extracto

El sedimento se resuspendió a razón de 12 mg · mL⁻¹ en disolución estabilizadora de sodio 50 mmol/L - urea 7 mol/L, seguido de 1h de agitación y centrifugación a 9 000g durante 15 min. El sobrenadante se recuperó hacia un tubo nuevo y el pH del extracto se ajustó a 8,0.

Cromatografía de afinidad

Se circularon tres volúmenes de columna (Vc) de disolución estabilizadora de equilibrio (fosfato de sodio, 50 mmol/L; urea, 7 mol/L; cloruro de sodio 1 mol/L, pH, 8,0) a través de la resina Ni-CAM HC (SIGMA) cargada con Ni²⁺. Se empleó una velocidad de flujo de 1 mL · min⁻¹. El extracto se aplicó a la columna manteniendo igual flujo de corrida. Tras cargar la muestra, el flujo se elevó a 2 mL · min⁻¹ para eluir todo el material no adherido al lecho. A continuación, se le circuló a la columna 3 Vc de disolución estabilizadora de lavado (fosfato de sodio, 50 mmol/L; urea, 7 mol/L; imidazol 10 mol/L; cloruro de sodio 1 mol/L, pH 8,0) para eluir las proteínas retenidas por adsorción inespecífica. La proteína de interés se colectó circulando por la columna 1,5 Vc de disolución estabilizadora de elución a un flujo de corrida de 1 mL · min⁻¹ (fosfato de sodio 50 mmol/L, urea 7 mol/L e imidazol 50 mmol/L). Cada fracción se examinó por electroforesis desnaturante en gel de acrilamida-SDS y la cantidad de proteína presente se cuantificó por el método de Lowry¹³ usando albúmina sérica bovina como estándar.

Preparación de muestras para SDS-PAGE

La cantidad apropiada de muestra se concentró por precipitación con ácido tricloroacético en presencia de desoxicolato de sodio.¹⁴ El sedimento concentrado se resuspendió en disolución estabilizadora de muestra 5 X (Tris-HCl 250 mmol/L pH 6,8; bromofenol azul 0,5 %; glicerol 50 %; SDS 10 % y ditiotreitol 500 mmol/L) y se incubó a 96 °C durante 10 min.

Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS

La muestra se aplicó en un gel de 12 % de poli(acrilamida) y se hizo la electroforesis vertical empleando una intensidad de corriente constante de 15 mA. Se utilizó como patrón de tallas moleculares el *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* de Promega. Las bandas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie.

Análisis densitométrico de geles para determinación del grado de pureza

El análisis de los geles para determinar el tamaño y la pureza de las bandas se realizó por densitometría, mediante el procesador de imágenes *Gene Tools Bioimagine system*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del plasmidio de expresión

Se amplificó por PCR un fragmento de talla igual a 1 kb con los oligos ompU directo y reverso a partir del ADN cromosomal de la cepa *V. cholerae* N16961 (Fig. 1, carril 2). El

corte con las enzimas de restricción *EcoR*I o *Sca*I originó bandas de 600 y 400 bp, lo que reveló la correspondencia del fragmento amplificado con el gen ompU.

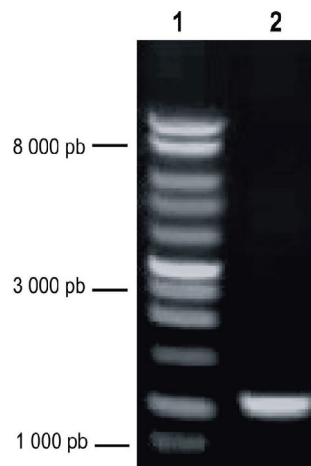


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de la reacción de PCR del gen ompU amplificado de la cepa *V. cholerae* N16961. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Promega), carril 2: alícuota del producto de la PCR.

El producto de PCR se clonó en el vector pUC19 en orientación contraria a *lacZ*. El plásmido resultante se denominó pOU11. El chequeo con las enzimas *Sac*I y *Pst*I produjo fragmentos de talla 3,6 kb en el primer caso y de 2,6 y 1,0 kb en el segundo, confirmando una correcta clonación. El inserto con el gen ompU se extrajo de este plásmido en forma de fragmento *Nco*I/*Sac*I, aprovechando sitios de corte adyacentes correspondientes al vector pUC19, y se introdujo en iguales sitios del vector pBAD/MyC-His C (Invitrogene), con lo que se obtuvo el plásmido pBCU1. Aquí el gen ompU se ubica cuesta abajo del promotor P_{BAD} de expresión controlada por arabinosa y retiene el codón de parada natural. La delección *Bgl* II de pBCU1 y el religamiento originó el vector pBCUR1 que contiene al gen ompU recombinante fusionado por el C-terminal al epitopo myc-hexa-his. La secuencia nucleotídica del inserto en el plasmidio se verificó experimentalmente y resultó correcta.

Expresión de la proteína recombinante en *E. coli* Top 10

La expresión de la proteína OmpU-myc-hexa-his en *E. coli* Top10 se comprobó por análisis del perfil proteico total de la cepa por SDS-PAGE y Western blot. Las muestras de los cultivos antes y después de la adición del inductor de expresión arabinosa fueron analizadas por SDS-PAGE. Tras la inducción, se observó una banda mayoritaria de tamaño molecular aparente calculado en 40 kDa (Fig. 2, panel A, carril 3) que no se detectó antes de la inducción (Fig. 2, panel A, carril 2). Esta talla se corresponde con la del monómero desnaturado de la proteína OmpU de *V. cholerae* (38 kDa),^{2,15,16} sumada a la talla de 2 kDa del epitopo myc-hexa-his fusionado al extremo c-terminal de OmpU. De igual forma, se detectó la presencia de una banda de talla molecular aparente calculada en 44 kDa ausente antes de la inducción.

La identidad de las proteínas expresadas se verificó por Western blot a muestras obtenidas de un mismo cultivo antes y después de inducir la expresión. La in-

munodetección, realizada con el anticuerpo monoclonal anti-OmpU 9H12E6¹⁷ reveló dos bandas que comigran con las mayoritarias de 40 y 44 kDa, detectadas por SDS-PAGE, lo que permitió concluir que se trataba de la proteína OmpU-hexa-his. La banda de 40 kDa corresponde aparentemente a la isoforma madura de OmpU desprovista de péptido señal y la de 44 kDa corresponde a la forma inmadura que retuvo el péptido señal. Se ha reportado que la proteína OmpU inmadura contiene una secuencia inicial de 21 aminoácidos de estructura primaria semejante a la de un péptido señal típico¹⁸ cuyo peso molecular estimado es de 2,24 kDa. La diferencia de talla molecular aparente entre las dos bandas es ligeramente mayor que este valor esperado, lo que pudiera relacionarse con la naturaleza heteróloga del hospedero utilizado para expresar esta proteína. La proteína OmpU madura natural de *V. cholerae* tiene un peso molecular estimado por secuencia de 36,6 kDa¹⁹ inferior al peso molecular de 38 kDa obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida.

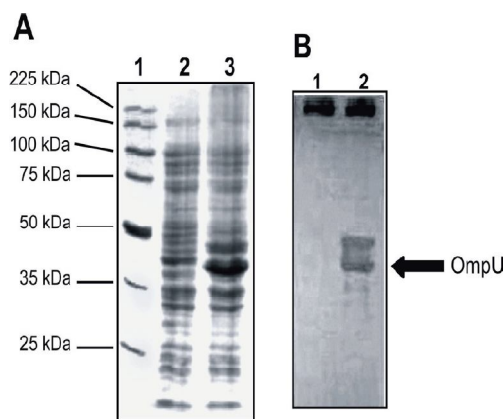


Fig. 2. Expresión de OmpU-myc-hexa-his recombinante en *E. coli* Top10 a partir del plásmido pBCUR1 visualizada por electroforesis desnaturante en gels de poliacrilamida con SDS (A) y Western blot (B) en muestras obtenidas antes y después de la inducción. Panel A, carril 1: patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega). Carril 2: extracto celular del cultivo antes de la inducción. Carril 3: extracto celular post-inducción con arabinosa al 0,002 %, durante 4 h en zaranda a 200 r/min, 37 °C. Las muestras fueron ajustadas a densidad óptica 5 a 600 nm. Panel B: carril 1: extracto celular de un cultivo antes de la inducción. Carril 2: extracto celular del cultivo post-inducción.

Ubicación de la proteína OmpU-myc-hexa-his

La detección de la localización de la proteína OmpU-myc-hexa-his se realizó mediante SDS-PAGE de las fracciones celulares obtenidas tras la ruptura ultrasónica del hospedero de expresión *E. coli* Top10. La proteína OmpU-myc-hexa-his recombinante detectada en el extracto celular completo (Fig. 3, carril 3) se localiza fundamentalmente en la fracción insoluble de los cultivos inducidos (Fig. 3, carril 2) y minoritariamente en la fracción soluble (Fig. 3, carril 1), lo que determinó la necesidad de extraer la proteína de interés de la fracción insoluble.

Evaluación de las condiciones de extracción

La urea es un agente caotrópico y desnaturante utilizado para extraer proteínas insolubles de cuerpos

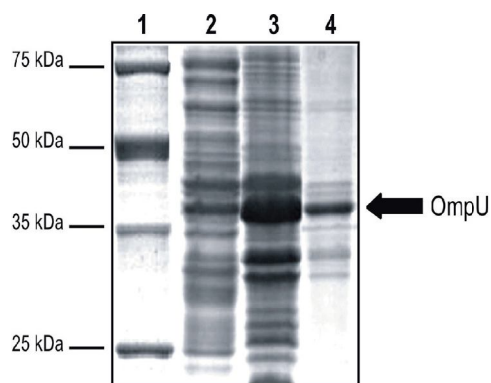


Fig. 3. SDS-PAGE de diferentes fracciones de la cepa *E. coli* TOP10 transformada con pBCUR1. Tiempo de colección de muestra 4 h post-inducción de la expresión con arabinosa 0,002 %. Carril 1: patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega). Carril 2: fracción soluble. Carril 3: fracción insoluble. Carril 4: extracto celular completo.

de inclusión bacterianos. El potencial para extraer la proteína OmpU-myc-hexa-his de los cuerpos de inclusión fue evaluado para tres concentraciones diferentes de urea (6, 7 y 8 mol/L) y dos tiempos de incubación 0,5 y 1 h (Fig. 4). El primero fue suficiente para solubilizar la proteína OmpU-myc-hexa-his siempre que se utilizara una concentración de urea de 7 u 8 mol/L, por lo que se seleccionó 7 mol/L de urea y este tiempo para la realización de este trabajo.

Cromatografía de afinidad para la purificación de la proteína OmpU-myc-hexa-his

Los extractos obtenidos por tratamiento con urea 7 mol/L, clarificados por centrifugación y ajustados a pH 8,0 (Fig. 5, panel B, carril CP) se aplicaron a una columna de OmpU-myc-hexa-his. La cola de polihistidina del epitopo C-terminal de OmpU-myc-hexa-his permite su adsorción a la matriz empleada. El ajuste del pH a 8,0 garantiza que la matriz y la cola de polihistidina estén correctamente cargadas y se produzca la interacción. La composición del eluato colectado al circular un exceso de disolución estabilizadora de equilibrio por la columna es esencialmente de contaminantes sin afinidad por la resina y aparentemente no contiene la proteína de interés (Fig. 5, panel B, carril F1). La mayor cantidad de la proteína OmpU-myc-hexa-his queda retenida en la matriz.

La aplicación de disolución estabilizadora de lavado que emplea imidazol 10 m mol/L, eluye de la columna una pequeña proporción de la OmpU-myc-hexa-his retenida en la matriz (Fig. 5, panel B, carriles F3 y F4); sin embargo, la mayor cantidad de la proteína de interés eluye solo tras la aplicación de disolución estabilizadora de elución (Fig. 5, panel B, carril F5). El contenido de imidazol 10 m mol/L y cloruro de sodio 1 mol/L en disolución estabilizadora de lavado, tiene como finalidad reducir las interacciones inespecíficas y prevenir las interacciones iónicas, respectivamente, lo que disminuye el enlace a la resina de proteínas contaminantes. La elución de la proteína con imidazol 50 mmol/L indica que las interacciones proteína-resina son débiles. Los datos de la purificación revelaron que la fracción correspondiente a OmpU-myc-hexa-his se colectó con un grado de pureza de 90 %, una masa molecular de 40 kDa y un rendimiento

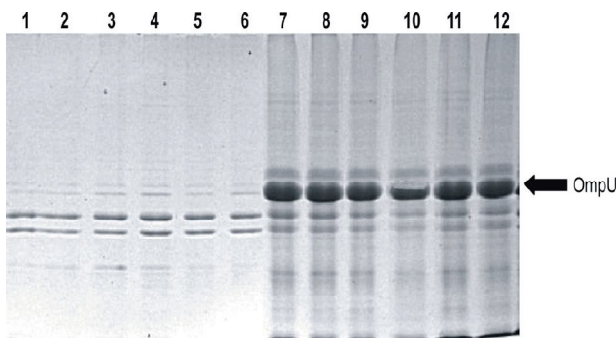


Fig. 4. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida - SDS para evaluar la eficacia de extracción de la proteína OmpU-myc-hexa-his de los cuerpos de inclusión empleando concentraciones de urea 6, 7 y 8 mol/L en tiempos de incubación de 0,5 y 1 h a 4°C. Carriles 1-3: fracción insoluble recuperada tras 1 h de incubación en urea 6, 7 y 8 mol/L, respectivamente. Carriles 4-6: fracción insoluble recuperada tras 0,5 h de incubación en urea 6, 7 y 8 mol/L, respectivamente. Carriles 7-9 fracción solubilizada tras 1 h de incubación en urea 6, 7 y 8 mol/L, respectivamente. Carriles 10-12: fracción soluble tras 0,5 h de extracción en urea 6, 7 y 8 mol/L, respectivamente.

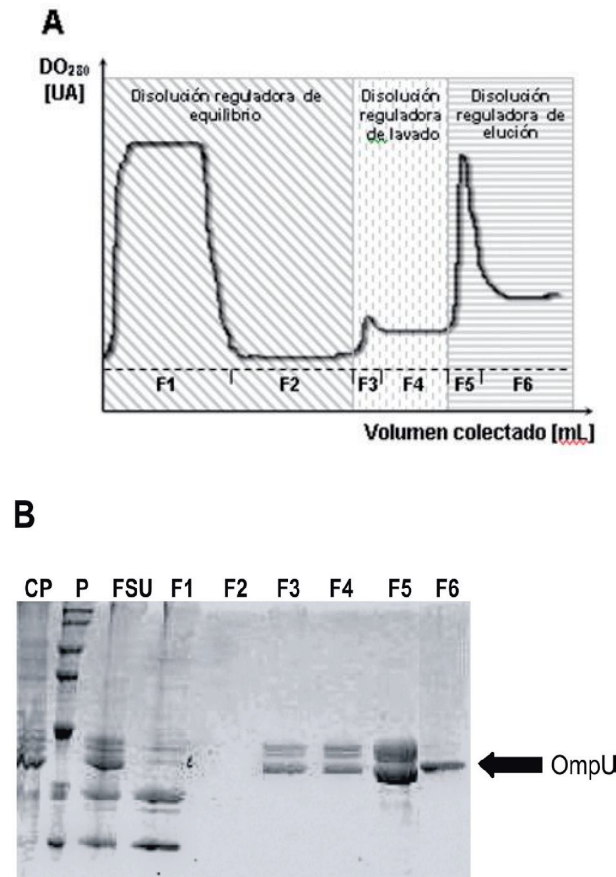


Fig. 5. Purificación de la proteína OmpU. Panel A: cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. Panel B: SDS-PAGE de las fracciones de la purificación. En el borde superior del gráfico se señalan las diferentes fracciones (F) obtenidas por cromatografía en correspondencia con el cromatograma del Panel A. CP extracto celular de *Vibrio cholerae* con OmpU natural como referencia, previamente identificada con el anticuerpo 9H12E6. P patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Weight Marker de Promega. FSU fracción soluble de la extracción con urea 7 mol/L.

de 23%. Las muestras de fracciones colectadas en distintos puntos del proceso de purificación se analizaron por Western blot con los anticuerpos anti-OmpU 9H12E6 y anti-hexa-histidina. El anticuerpo anti-OmpU reaccionó con bandas de movilidad relativa mayor que la de la proteína de 40 kDa OmpU-myc-hexa-his (Fig. 6, panel A, carriles 1, 2, 3 y 4). Este resultado sugiere que la(s) proteasa(s) del hospedero fragmentan parcialmente, pero de forma específica la proteína heteróloga y originan segmentos reconocidos por el AcM 9H12E6. En cambio, no todos los fragmentos de OmpU-myc-hexa-his reconocidos por el AcM 9H12E6, lo fueron por el anticuerpo anti-hexa-histidina. Ello indica que mientras el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-hexa-his se encuentra ubicado hacia el extremo c-terminal de la proteína, el sitio de reconocimiento de OmpU por el AcM 9H12E6 se encuentra distante del c-terminal, separado de este al menos por un sitio de reconocimiento y corte de la proteasa supuesta. Ello hizo posible también obtener el producto OmpU-myc-hexa-his purificado desprovisto de los productos de degradación antes mencionados (Fig. 6 A y B, carril 6). En el presente trabajo se informa por primera vez la producción heteróloga en *E. coli* de la proteína OmpU de *V. cholerae*. Además, la construcción genética obtenida es apropiada para expresar la proteína en *E. coli* en forma de una fusión genética con una cola de seis histidinas que facilita la posterior purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.

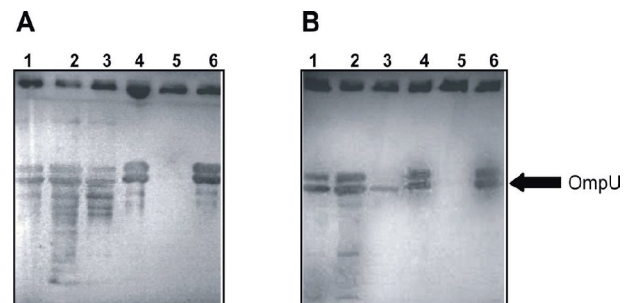


Fig. 6. Western blot de las fracciones obtenidas en las etapas del proceso de purificación de OmpU-myc-hexa-his. Las proteínas separadas por SDS - PAGE 12 %, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas con los anticuerpos anti-OmpU 9H12E (Panel A) o anti-hexa-histidina (Panel B). Carril 1: lisado celular total de *E. coli* Top10 (pBCUR1). Carril 2: fracción insoluble tras la ruptura ultrasónica. Carril 3: fracción soluble tras la ruptura ultrasónica. Carril 4: fracción solubilizada en urea 7 mol/L antes de cargar en la columna. Carril 5: lavado. Carril 6: OmpU-myc-hexa-his purificada por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados.

CONCLUSIONES

El plásmido pBCUR1 es útil para expresar la proteína OmpU-myc-hexa-his en *Escherichia coli*. La extracción con urea, seguida de cromatografía de afinidad a iones metálicos en condiciones desnaturalizantes permite obtener en un solo paso, la proteína OmpU-myc-hexa-his con un 90 % de pureza y un rendimiento del 23 %.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wibbenmeyer J.A., Provenzano D., Landry C.F., Klose K.E. and Delcour A.H. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT Porins are differentially affected by bile. **Infection and Immunity**, **70**, 121-126, 2002.
2. Chakrabarti S.R., Chaudhurik S.K. and Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and Characterization of OmpU. **Journal of Bacteriology**, **178**, 524-530, 1996.
3. Mathur J. and Waldor M.K. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, **72**, 3577-3583, 2004.
4. Guillaume D. and Delcour A.H. Deoxycholic Acid Blocks *Vibrio cholerae* OmpT but Not OmpU Porin. **J. Biol. Chem.**, **281**, 19899-19905, 2006.
5. Dormair, K., Kiefer H. and JahÚnig F. Refolding of an integral membrane protein. **J. Biol. Chem.**, **265**, 18907-18911, 1990.
6. Provenzano D. and Klose K.E. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, **97**, 10220-10224, 2000.
7. Provenzano D., Schuhmacher D.A., Barker L. and Klose K.E. The virulence regulatory protein ToxR mediated enhanced bile resistance in *V. cholerae* and other pathogenic vibrio species. **Infection immunity**, **68**, 1491-1497, 2000.
8. Sperandio V., Giron J., Silveira W.D. and Karper J. The OmpU Outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **63**, 11, 4433-4438, 1995.
9. Manual de Instrucción. pBAD/His A, B, and C pBAD/Myc-His A, B, and C.; Vectors for dose-dependent expression of recombinant proteins containing N- or C- terminal 6xHis Tags in *E. coli*. Catalog Nos. V430-01, V440-01. Invitrogen life technologies.
10. The QIAexpression purification manual.pdf. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag-Protein_Purification/Ni-NTA/QUIAGEN_NiNTA. (Consultado: 15 de marzo de 2003).
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
12. Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, **16**, 6127, 1988.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. A protein measurement with the folin - phenol reagent. **Biol. Chem.**, **193**, 265-275, 1951.
14. Walter J.M. The protein protocols Handbook 2nd edition. Humana Press Inc., Totowa, N.J. page 991, 2002.
15. Perez J.L., González Y., Año G., Cedré B., Valmaseda T., Alvarez M. Serrano D., Millían E., Fariñas M., y Talavera A., García L. Obtención de extractos de membrana externa de *Vibrio cholerae* O1, mediante el uso de diferentes detergentes. **VaccciMonitor**, **15**, 1: 1-7, 2006.
16. Valérie C., Simonet A.B., Klose K.E., and Delcour A.H. The *Vibrio cholerae* Porins OmpU and OmpT Have Distinct Channel Properties. **J. Biol. Chem.**, **278**, 17539-17545, 2003.
17. Falero-Díaz G., Rodríguez B.L., Rodríguez I., Suzarte E., Otero O., Núñez N., Serrano D., Solís R.L., Moreno A., Fando R.; Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae*. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **39**, 2008.
18. Pugsley A.P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, **57**, 50-108, 1996.
19. Sperandio V., Bailey C., Giron J., DiRita V.J., Silveira D., Vettore A.L., and Kaper J.B. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **64**, 12, 5406-5409, 1996.