

Características del bacteriófago virulento C1 de estreptococos del grupo C. II Propiedades físicoquímicas y moleculares del ADN del fago C1

J. L. COLL¹, T. V. GUPALOVA², A. N. SUVOROV², V. I. GOLUBKOV² y A. A. TOTOLIAN²

1. Dirección de Investigaciones Científicas, D. C.

2. Instituto Científico Investigativo de Medicina Experimental de Leningrado, URSS

Recibido en febrero de 1986

RESUMEN

El bacteriófago virulento C1 es capaz de reproducirse en estreptococos de los grupos C y A, bacterias capaces de causar enfermedades en animales y en el hombre. Un conocimiento mayor del fago C1 podría contribuir al estudio de los estreptococos correspondientes mediante el intercambio genético. Los resultados de este trabajo muestran que el ADN-C1 presenta una densidad de flotación de 1,705 g/cm³ - CsCl, temperaturas de fusión de 75 y 88°C. Siete de las 15 restrictasas incubadas con el ADN-C1 no exhibieron sitio de reconocimiento en su secuencia, el mapa físico fue construido para las ocho endonucleasas restantes. Fueron clonados los fragmentos B y B-C-Hind III en pBR 322. Los estudios preliminares de estos clones no mostraron la presencia de LAF en los extractos bacterianos.

SUMMARY

The virulent bacteriophage C1 is able to reproduce in groups C and A streptococci, bacteria able to produce diseases in man and animals. Better knowledge of phage C1 would contribute to the study of the correspondent streptococci through the genetic interchange. The results of this work show that the DNA presents a 1,705 g/cm³ - CsCl flotation density and melting temperatures of 75°C and 88°C. Seven of fifteen restrictases incubated with DNA-C1 didn't recognize sites in their sequences; the physic map was constructed for the other eight endonucleases. The fragments B and B-C-Hind III in pBR 322 were cloned. Preliminary studies of these clones didn't show the presence of LAF in the bacterial extracts.

INTRODUCCION

Como se expresa en la primera parte de este trabajo (Coll *et al.*, 1986), es necesario conocer las características físico-químicas y biomoleculares de las partículas, proteínas y ADN de los bacteriófagos de estreptococos para estudiar los factores de patogenicidad de las bacterias correspondientes. Esas características han sido reportadas para algunos de los bacteriófagos del grupo H. Según el trabajo anteriormente referido, además de los reportes sobre las características morfológicas y biológicas de las partículas de los fagos del grupo C, fueron estudiadas la morfología y propiedades biomoleculares de las partículas y proteínas del bacteriófago C1 de estreptococos.

En el presente trabajo se estudiaron las propiedades físico-químicas y moleculares del ADN del fago C1.

MATERIALES Y METODOS

La obtención y cultivo de la cepa de estreptococos C 4540 y el cultivo y purificación del fago C1, fueron referidos en la parte I del presente trabajo. Para la obtención del ADN isotópico del fago se añadió ^3H -timina (10-20 $\mu\text{C}/\text{ml}$) al medio de cultivo. La titulación del fago se hizo por el método de Totolian (1960).

Obtención del ADN del fago

Se hizo por el método de Kaiser e Inman (1965). En todos los casos, antes de la obtención del ADN del fago, los corpúsculos fueron incubados con ADNasa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ARNasa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ambos de la firma Sigma. Los plásmidos de *E. coli* se obtuvieron según Clewell y Helinski (1970). La nucleasa S1 fue obtenida por el método de Sutton (1971).

Propiedades físico-químicas del ADN del fago

La densidad de flotación se determinó por centrifugación diferencial en CsCl. A 8 ml del buffer TE (5 mM Tris-HCl, 0,2 mM EDTA pH 7,5) conteniendo 20 000 cpm del ^3H ADN del fago, se le añadió 9,5 g de CsCl y se centrifugó 105 000 g durante 60 horas a 4°C en una centrífuga Spinco L2-65B.

El contenido del par guanina-citosina (G-C) se calculó por el método de Schildkraut *et al.* (1962); la temperatura de fusión (T_p) según Salzberg *et al.* (1977); la concentración del ADN se midió espectrofotométricamente.

Endonucleasas, ligasas y ADN λ

Las restrictasas Hind III, Sal GI, Eco RI, Ben I, Cfr I, Msp I, Sdu I, ADN ligasa T4 y ADN del fago λ fueron obtenidas de VNIPE, Vilnius, URSS; Bsu RI, Eco SK del IVS-Menchikov, Moscú, URSS; Ban HI, Sma I del IBFM, AN, Pushino Na Okie, URSS; Kpn I, Hae II, Bgl II, Pst I de Bethesda Research Laboratories, EE.UU.

Las electroforesis del ADN y sus fragmentos fueron realizadas según Sharp *et al.* (1972) en gel de agarosa 1-2 por 100 en equipos de la Reanal y en equipos lámino-verticales de Sudgen *et al.* (1975). Los pesos moleculares fueron calculados según Murray y Murray (1974) y el catálogo de la BRL (1980).

Clonación de los fragmentos del ADN del fago C1

El hidrolizado del ADN del fago C1 y pBR 322, por Hind III fueron ligados por el método de De Vries *et al.* (1976) y la transformación de *E. coli* HB 101 fue llevada a cabo según Cohen *et al.* (1972). El ADN de los clones de recombinación fue obtenido por el método de Birnboim y Doly (1978).

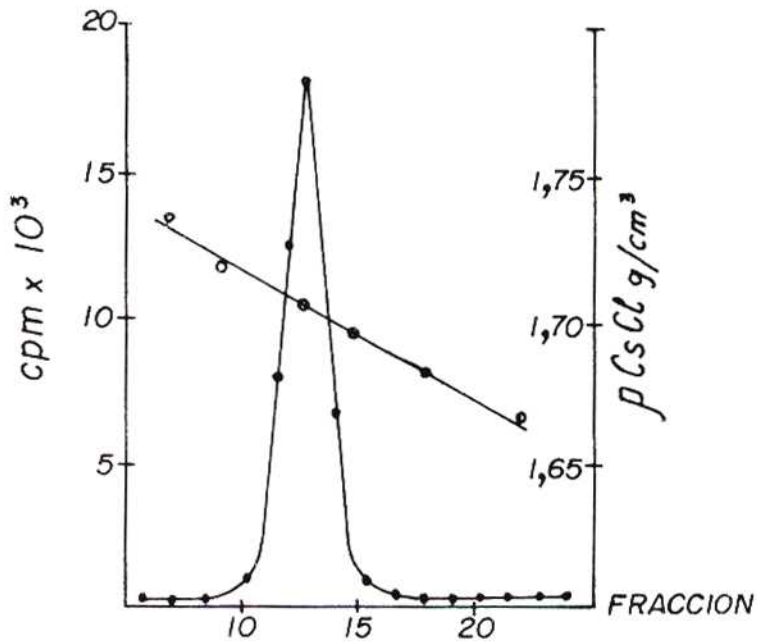
Las hidrólisis del ADN del fago por las endonucleasas se llevaron a cabo en el buffer 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, pH 7,5; las restrictasas se añadieron según el cálculo de 2-3 unidades/ μg de ADN. El volumen de las pruebas fue hasta de 50 μl y se incubaron a 37°C de 60-120 minutos. Las reacciones se detuvieron por incubación a 65°C durante 10 minutos. Se añadió una solución en una relación 1:5 v/v de SDS 5 por 100, glicerina 25 por 100 y bromofenol azul 2,5 mM para las electroforesis.

RESULTADOS

La fracción de radiactividad máxima del ^3H ADN-C1 correspondió a la densidad de 1,705 g/cm^3 en CsCl (figura 1, tabla 1); de este valor se calculó el contenido del par G-C del genoma del fago que resultó de 46 por 100.

Tabla 1

<i>Propiedades del ADN</i>	
Densidad de flotación en gradiente de CsCl	1,705 g/cm ³
Presencia del par G-C	46 por 100
Temperatura de fusión	75 y 88°C
Longitud de ADN del fago (Kb)	16,9
<i>En el ADN del fago CI</i>	
Endonucleasas	Número de sitios de reconocimiento
Sal GI	1
Sdu	1
Eco SK	1
Hae II	3
Hind III	4
Cfr I	8
Eco RI	10
Bsu RI	15

FIG. 1. Perfil de ³H ADN CI en gradiente de densidad de cloruro de cesio

La temperatura de fusión (T_f) se determinó por hidrólisis de las zonas del ^3H ADN desnaturizado, por la nucleasa SI. La T_f del ADN-C1 se caracteriza por dos zonas de fusión, una a la temperatura de 75°C y la otra a la temperatura de 88°C (figura 2, tabla 1).

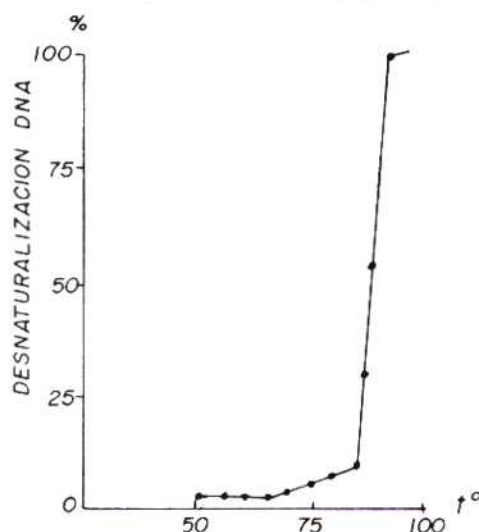


FIG. 2. Temperatura de fusión del ADN C1.

Para los análisis de restricción del ADN-C1 fueron utilizadas 15 endonucleasas. Ocho de ellas: *Sal GI*, *Sdu I*, *Hind III*, *Hae II*, *Cfr I*, *Eco SK*, *Eco RI*, *Bsu RI*, hidrolizan el ADN-C1 (tabla 2); las siete restantes no presentan actividad frente al ADN-C1. La figura 3 es un ejemplo de los electroforegramas realizados en los análisis de restricción.

Tabla 2

LONGITUD MOLECULAR, EN Kb, DE LOS FRAGMENTOS QUE SE FORMAN EN LA HIDROLISIS SIMPLE DEL ADN DEL FAGO C1 POR LAS ENDONUCLEASAS

Fragmento	<i>Bsu RI</i>	<i>Eco RI</i>	<i>Cfr I</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hae II</i>	<i>Sal GI</i>	<i>Sdu I</i>	<i>Eco SK</i>
A	3,3	3,2	3,9	13,9	6,0	16,0	11,9	16,0
B	1,8	3,0	3,3	1,5	4,9	1,9	5,0	1,0
C	1,5	2,4	3,0	1,2	4,0			
D	1,3	2,2	1,5	0,7	1,1			
E	1,0*	1,7	1,5	0,6				
F	1,0*	1,0	1,3					
G	0,8*	0,9	1,0					
H	0,8	0,7	0,4					
I	0,7	0,5	0,4					
J	0,4*	0,4*						
K	0,4							
L	0,3							
<hr/>								
ADN-C1 en Kb	16,5	16,4	16,3	17,9	16,0	17,9	16,9	17,0

Media: 16,9 Kb, longitud de la molécula de ADN-C1

* Zona que contiene doble cantidad de fragmentos

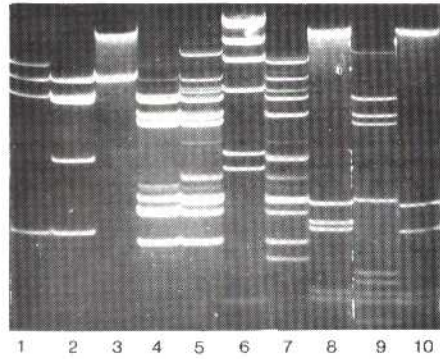


FIG. 3. Electroforegrama de los hidrolizados del ADN C1 por las endonucleasas (de izquierda a derecha): 1- Hae II, 2- Hae II + Sdu I, 3- Sdu I, 4- Hae II + Cfr I*, 5- Cfr I*, 6- Hind III-ADN-λ, 7- Cfr I + Sdu I*, 8- Hind III + Sdu I, 9- Cfr I + Hind III, 10- Hind III.

* hidrólisis incompleta

En la hidrólisis del ADN C1 por las endonucleasas Eco RI y Bsu RI se producen zonas de color más intenso que el correspondiente, observándose a simple vista en los geles de electroforesis y que se diferencian en los densitogramas de los negativos de dichos geles. En la tabla 2 se señalan estas zonas de doble fragmento; para la enzima Bsu RI son las zonas E, F, G y J, y para Eco RI sólo la zona J. Para Eco RI se calcula once fragmentos y dieciséis fragmentos para Bsu RI.

Tabla 3

RESULTADOS DE LA HIDROLISIS INCOMPLETA DEL ADN-C1 POR RESTRICTASAS

Restrietasas	Números de fragmentos de la hidrólisis incompleta	Longitud molecular de los fragmentos (en Kb)	Posible composición de los fragmentos de la hidrólisis incompleta
Hind III	1	2,6	B(1,5) + C(1,2) = 2,7
	2	2,1	B(1,5) + D(0,7) = 2,2
	3	1,8	C(1,2) + E(0,6) = 1,8
Hae II	1	10,0	A(6,0) + C(4,0) = 10,0
	2	9,1	B(4,9) + C(4,0) = 8,9
	3	7,4	A(6,0) + D(1,1) = 7,1
Eco RI	1	6,6	A(3,2) + B(3,0) + J(0,4) = 6,6
	2	4,4	C(2,4) + F(1,0) + G(0,9) = 4,3
	3	4,0	D(2,2) + E(1,7) = 3,9
	4	3,6	A(3,2) + I(0,5) = 3,7
	5	3,5	B(3,0) + J(0,4) = 3,4
	6	1,3	F(1,0) + J(0,4) = 1,3
	7	1,2	H(0,7) + I(0,5) = 1,2
Cfr I	1	7,3	A(3,9) + C(3,0) = 6,9
	2	4,9	B(3,3) + D(1,5) = 4,8
	3	4,3	C(3,0) + F(1,3) = 4,3
	4	4,2	A(3,9) + I(0,4) = 4,3
	5	2,5	E(1,5) + G(1,0) = 2,5
	6	1,8	F(1,3) + H(0,4) = 1,7
	7	1,6	F(1,3) + I(0,4) = 1,7

La hidrólisis incompleta del ADN-CI por las restructasas se obtuvo con la disminución de la concentración de la enzima hasta 0,1 unidades sin modificación del tiempo de incubación de las pruebas a la temperatura de 37°C. En la figura 3(5) se observa una hidrólisis incompleta espontánea de Cfr I. En la tabla 3 se muestra la longitud de los fragmentos de la hidrólisis incompleta y se sugieren los fragmentos de la hidrólisis completa que pueden dar lugar a estos.

Los resultados de la hidrólisis simultánea por dos restructasas se muestran en la tabla 4, donde aparecen ejemplos en la figura 3(2), (4), (7), (8) y (9).

Tabla 4
HIDROLISIS DEL ADN-CI POR DOS ENDONUCLEASAS

<i>Endonucleasas 1 + 2</i>	<i>longitud molecular de los fragmentos que se forman en la hidrólisis (en Kb)</i>								
1. Hin III + Cfr I	3,9	3,3	3,0	1,5	0,7	0,7	0,7	0,5	
	0,4	0,4	0,4						
2. EcoRI + Cfr I	3,2	2,5	1,7	1,7	1,4	1,0	0,9	0,7	
	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3		
3. Eco RI + Bsu RI	1,8	1,7	1,7	1,4	1,3	1,0	1,0	0,8	
	0,8	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	
	0,2	0,2							
4. Eco RI + Sal GI	3,2	3,0	2,2	1,9	1,7	1,0	0,9	0,7	
	0,5	0,5	0,4	0,4					
5. Eco RI + Hae II	3,2	2,4	2,2	1,7	1,3	1,1	1,0	0,9	
	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4				
6. Eco RI + SRdu I	3,3	2,6	2,4	2,2	1,7	1,0	0,9	0,7	
	0,5	0,4	0,4	0,4					
7. Bsu RI + Sdu I	3,3	1,8	1,5	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	
	0,8	0,8	0,8	0,7	0,4	0,4	0,4	0,3	
8. Bsu RI + Sal GI	3,3	1,8	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	
	0,8	0,8	0,8	0,7	0,6	0,4	0,4	0,4	
	0,3								
9. Bsu RI + Hae II	3,3	1,8	1,3	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	
	0,8	0,8	0,7	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	
10. Bsu RI + Hind III	3,3	1,8	1,3	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	
	0,7	0,7	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	
	0,4	0,4	0,3						
11. Cfr I + Hae II	3,9	3,3	3,0	1,5	1,3	1,3	1,0	0,4	
	0,4								
12. Cfr I + Sdu I	3,9	3,3	2,1	1,5	1,5	1,3	1,0	0,9	
	0,4	0,4							
	4,9	4,0	3,9	2,1	1,1				
14. Sal GI + Hind III	13,9	1,3	1,2	0,7	0,6	0,2			
15. Hae II + Hind III	4,9	4,0	3,3	1,5	0,7	0,7	0,6	0,5	
16. Sdu I + Hind III	11,9	1,5	1,2	1,0	0,7	0,6			
17. Sal GI + Eco SK	1,5	1,9	1,0						
18. Sal GI + Sdu I	11,9	3,1	1,9						
19. Eco SK + Sdu I	11,0	5,0	1,0						
20. Sal GI + Hae II	5,2	4,9	4,0	1,1	0,8				
21. Cfr I + Sal GI	3,9	3,3	3,0	1,5	1,3	1,0	1,0	0,5	
	0,4	0,4							
22. Cfr I + Eco SK	3,9	3,0	2,3	1,5	1,5	1,3	1,0	1,0	
	0,4	0,4							
23. Eco RI + Eco SK	3,2	3,0	2,4	2,2	1,0	1,0	0,9	0,7	
	0,7	0,5	0,4	0,4					
24. Eco RI + Hind III	3,2	3,0	2,2	1,7	1,2	0,9	0,7	0,7	
	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,3			

Los hidrolizados del ADN-C1 y pBR 322 por Hind III fueron ligados enzimáticamente (Ligasa T4) y con esta mezcla fue llevada a cabo la transformación de la cepa *E. coli* HB 101. De los clones transformados (genotipo Amp^r, T^S) fueron obtenidos los plásmidos que contenían fragmentos Hind III del ADN-C1 (figura 4)

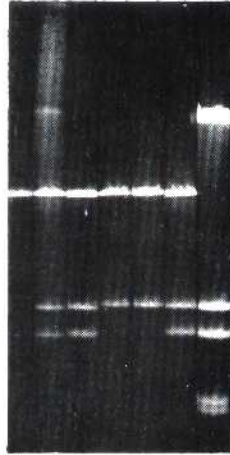


FIG. 4. Electroforegrama fragmentos Hind III de los plásmidos (de izquierda a derecha): 1- pBR 322, 2- pCC10, 3- pCC 11, 4- pCC 02, 5- pCC 08, 6- pCC 21, 7- ADN-C1.

En la figura se observa que los plásmidos híbridos pCC 10, pCC 11 y pCC 21 contienen los fragmentos B y C Hind III del ADN-C1, y los plásmidos pCC 02 y pCC 08 contienen el fragmento B-Hind III, de esta manera parte del genoma del fago C1 fue clonado.

Los extractos de los cultivos HB 101 - pCC-10, 11 y 21, que contienen fragmentos del ADN-C1 fueron incubados con una suspensión de estreptococos SM60, no observándose disminución de la DO⁶⁵⁰.

Del análisis de los resultados de la hidrólisis simple, doble e incompleta, y de la clonación, se logró construir el mapa físico del ADN-C1 (figura 5) para ocho restrictasas.

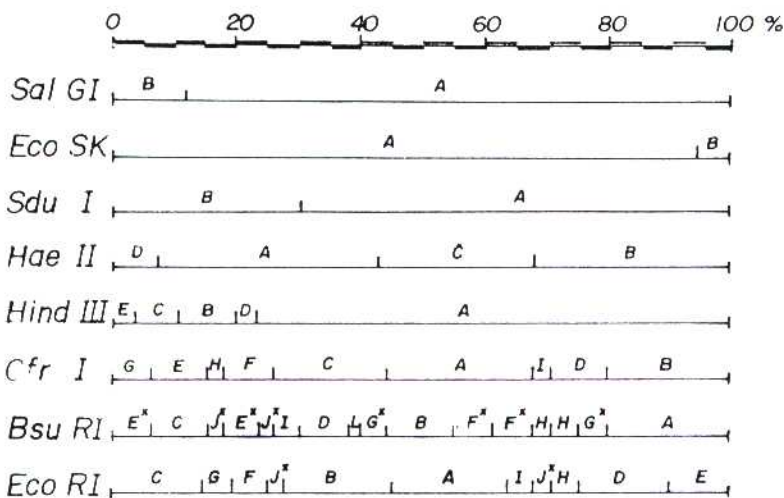


FIG. 5. Mapa físico del ADN C1

En el caso de los fragmentos de la misma letra (igual longitud) para una restrictasa, no fue establecida su localización definitiva; puede que se intercambien en posición, lo que se señala con un supraíndice en la figura.

DISCUSION

En ADN de este fago presenta dos temperaturas de fusión: una a 75°C y otra a 88°C; la primera sugiere una zona más rica en el par adenina-timina y la densidad de flotación (un solo máximo en 1,705 g/cm³ CsCl) indica homogeneidad.

Según los datos obtenidos en este trabajo, se evidencia que el ADN-CI es una molécula lineal de doble hebra con una magnitud de 16,9 kb. En el análisis de restricción doble se observa el número de fragmentos que es de esperar de una molécula lineal. La nucleasa SI, enzima que solo hidroliza cadenas de ácidos nucleicos de una sola hebra, no presenta actividad frente al ADN-CI nativo, y sin embargo, es capaz de hidrolizarlo completamente cuando se desnaturaliza como se muestra en la determinación de la temperatura de fusión.

Las investigaciones preliminares de los clones que contienen los fragmentos B y B-C-Hind III en pBR 322 de *E. coli* no evidenciaron la presencia de lisozima asociada al fago (LAF).

Como se expresa en los resultados, se ha logrado la localización relativa de los sitios de reconocimiento de ocho restrictasas en el ADN-CI, quedando solo incertidumbre en cuanto a la posición en el mapa físico de aquellos fragmentos de la misma magnitud, lo que podrá ser dilucidado en trabajos posteriores.

Los resultados que ofrece el presente trabajo sobre el bacteriófago CI de estreptococos pueden contribuir al conocimiento del propio fago y de las bacterias hospederas mediante el intercambio genético.

REFERENCIAS

- Bethesda Research Laboratories (1980). *Catalog Copyright BRL*, Rockville, Maryland, USA.
- BIRNBOIM, H. C. y J. DOLY (1978). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acid Res. 7: 1513-1524.
- CLEWELL, D. B. y D. R. HELINSKI (1970). *Properties of a deoxyribonucleic acid protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event*. Biochemistry 9: 4428-4440.
- COHEN, S. N.; A. C. CHANG y C. L. HSU (1972). *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. General transformation of E. coli by R factor DNA*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114.
- DE VRIES, F. A. J.; C. J. COLLINS y D. A. JACKSON (1976). *Joining of simian virus 40 DNA molecules at endonuclease R Eco RI sites by polynucleotide ligase and analysis of the products by agarose gel electrophoresis*. Biochem Biophys Acta 435: 213-227.
- KAISER, A. D. e INMAN, R. B. (1965). *Cohesion and the biological activity of bacteriophage DNA*. J. Mol. Biol. 13: 78-85.
- MURRAY, N. E. y K. MURRAY (1974). *Manipulation of restricted targets in phage to form receptor chromosomes for DNA fragments*. Nature 251: 476-481.
- SALZBERG, S.; Z. LEVI; M. ABOUD y A. GOLDBERGER (1977). *Isolation and characterization of DNA-DNA and DNA-RNA hybrid molecules formed in solution*. Biochemistry 16: 25-29.
- SCHILDKRAUT, C. L.; S. MARMUR y P. DOTY (1962). *Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl*. J. Mol. Biol. 4: 430-443.
- SHARP, P. A.; MING-TA HSU; E. OHTSUBO y N. DAVIDSON (1972). *Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of Escherichia coli. I. Structure of F-pime factors*. J. Mol. Biol. 71: 471-497.
- SUDGEN, B.; B. DETROY; B. ROBERTS y J. SAMBROCK (1975). *Aparate for electrophoresis*. Anal. Biochem. 68: 36-46.

- SUTTON, W. D. (1971). . *A crude nuclease preparation suitable for use in DNA reassociation experiments.* Biochem Biophys Acta **240**: 522-531.
- TOTOLIAN, A. A. (1960). *K izucheniyu streptokokkovykh bakteriofagov. II. Lizogeniya y streptokokkov. Diapason liticheskoi aktivnosti fagov. Vliyaniye tripsina na adsorbtsionnyuyu sposobnost fagov.* Yezhegodnik za 1959g. Isg. IEM AMN CCCP, L., str. 346-350;