

Instytut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Ogólnej

Maria WICIŃSKA, Ewa PONIATOWICZ,
Wincenty DROŻAŃSKI

Określenie składu zasad DNA bakterii patogenicznej dla ameb

Определение состава щелочей ДНК бактерии, патогенной для амёб

Determination of Base Composition of DNA from a Bacterium Pathogenic
for Amoebae

Bakteria patogeniczna dla ameb została wyizolowana z ameby glebowej przez Drożńskiego (4). Otrzymano ją w czystej kulturze ameba—pasożyt bakteryjny (6) i częściowo scharakteryzowano. Jest to Gram-ujemna pałeczka o wymiarach $1,3-2,1 \mu \times 0,6-0,8 \mu$, o lofotrichalnym urzęsieniu, nie wytwarzająca endospor ani otoczek (5). Drobnoustrój ten, zakażając *Acanthamoeba castellanii*, powoduje zmiany w rozmieszczeniu organelli komórkowych, ich uszkodzenie, a następnie całkowitą lizę komórki gospodarza (8). Nie obserwowano wzrostu bakterii na podłożach bakteriologicznych i na dezintegracji amebowym (7). Namnaża się ona w wolno żyjących amebach, wyizolowanych z gleby i zbiorników wodnych, nie zakaża zarodków kurzych, myszy, świnek morskich i królików (5). Mimo że znana jest morfologia bakterii patogenicznej dla ameb i budowa mureiny w jej ścianie komórkowej (Drożński, dane nie opublikowane) nie została ona dotychczas sklasyfikowana z powodu trudności w określeniu jej wymagań wzrostowych (7).

W niniejszej pracy ustalono procentową zawartość par zasad guanina—cytozyna (GC) i adenina—tymina (AT) w DNA bakterii patogenicznej dla ameb.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. *Acanthamoeba castellanii* — szczep otrzymany od Dr. W. Balamutha (Department of Zoology University of California). Bakteria patogeniczna dla ameb — wyizolowana przez Drożńskiego (Instytut Mikrobiologii UMCS). *Micrococcus lysodeikticus* (Muzeum szczepów Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS).

Otrzymywanie masy bakteryjnej. *Acanthamoeba castellanii* namnażano na wytrząsarce w temp. 28°C w 500 ml kolbach Erlenmeyera, zawierających po 250 ml pożywki dla ameb, wg B a n d a (1). Hodowlę ameb w logarytmicznej fazie wzrostu (ok. 2×10^6 komórek/ml) zakażano 10 ml hodowli bakterii patogennej dla ameb i nadal inkubowano, aż do uwolnienia drobnoustrojów z komórek gospodarza (24—48 godz.). Bakterie, odwirowane przy 6000 obr./min. przez 20 min., oddzielano od cyst i ameb, które nie uległy lizie przez wirowanie przy 1000 obr./min. przez 10 min. Enzymy hydrolityczne zawarte w lizosomach i sedymentujące razem z bakteriami przeprowadzano w formę rozpuszczalną, dodając do zawiesiny bakterii w płynie fizjologicznym Triton X-100 w stężeniu 0,1%. W celu oddzielenia bakterii od rozpuszczalnych hydrolaz, w tym DNA-zy amebowej, zawiesinę komórek bakterii nanoszono na 15% roztwór sacharozy i wirowano przy 6000 obr./min. przez 30 min. Procedurę powtarzano kilkakrotnie, aż do zaniku w supernatancie aktywności DNA-zy (9).

Micrococcus lysodeikticus namnażano na płytkach Petriego z agarem odżywczym. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C bakterie zawieszano w 0,15 M NaCl+0,1 M EDTA pH 8,0 i odwirowywano przy 6000 obr./min. przez 20 min.

Izolowanie DNA. DNA izolowano zmodyfikowaną metodą Marmura (13). 5 g wilgotnej masy bakteryjnej zawieszano w 60 ml 0,15 M NaCl+0,1 M EDTA pH 8,0 i trawiono lizozymem (50 mg) przez 20 min. w temp. 37°C. Następnie dodawano 5 ml 25% roztworu SDS i inkubowano przez 20 min. w temp. 60°C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodawano nadchloran sodu do stężenia 1 M i odbiałczano równą objętością mieszaniny chloroform—alkohol izoamyłowy (24:1), łagodnie mieszając przez 20 min. Po odwirowaniu przy 5000 obr./min. przez 20 min., DNA znajdujące się w fazie wodnej wytrącano ochłodzonym etanolem. Precypitat rozpuszczano w 0,015 M NaCl+0,0015 M cytrynianu sodu (SSC) pH 7,0, dodawano RNA-zę do stężenia 50 µg/ml i inkubowano 30 min. w temp. 37°C. Następnie DNA poddawano odbiałczaniu i wytrącano etanolem. Odbiałczanie prowadzono kilkakrotnie do chwili, kiedy nie wykryto obecności białka metodą Lowry (11). Po rozpuszczeniu DNA w SSC dodawano 1/5 objętości 3 M octanu sodu+0,001 M EDTA pH 7,0, a następnie wytrącano DNA, dodając kroplami 0,54 objętości izopropanolu. Precypitat przemywano 70% etanolem i rozpuszczano w SSC. W celu otrzymania DNA bakterii patogennej dla ameb komórki bakterii poddawano dwukrotnej dezintegracji ultradźwiękami o amplitudzie 4, 8, 12, 14 i 16 µm w temp. 0°C w czasie 30 sek. dla każdej amplitudy, stosując 30-sekundowe przerwy. Przed inkubacją z SDS dezintegrat trawiono pronazą (0,5 mg/ml) przez 20 min. w temp. 37°C. Obok otrzymanych preparatów DNA z *M. lysodeikticus* i bakterii patogennej dla ameb w oznaczeniach składu zasad DNA stosowano preparat handlowy DNA z grascy cielejcej (Sigma).

OZNACZANIE SKŁADU PROCENTOWEGO ZASAD DNA

Metoda depurynacji. Roztwór DNA o stężeniu 400—800 µg/ml (0,5 ml) umieszczano w workach dializacyjnych wygotowanych w SSC pH 7,0 i przepłukanych SSC pH 1,58. Worki przenoszono do probówek zawierających po 6 ml SSC pH 1,58. Po 24 godz. delikatnego wytrząsania w temp. 37°C oznaczano gęstość optyczną (OD) dializatu w zakresie bliskiego ultrafioletu wobec standardowego roztworu SSC pH 1,58. Molową frakcję GC obliczano wg wzoru:

$$X_G = \frac{a-bR}{a-c+(d-b)R} \quad (10),$$

gdzie X_G = molowa część guaniny, $R = OD_{245}/OD_{280}$, a, b, c, d = wielkości wyznaczone doświadczalnie: $a=13,25$ — molarna absorpcja adeniny przy 265 nm, $b=5,2$ — molarna absorpcja adeniny przy 280 nm, $c=7,4$ — molarna absorpcja guaniny przy 265 nm, $d=7,0$ — molarna absorpcja guaniny przy 280 nm.

Wyznaczanie punktu topnienia T_m . Oznaczanie temperatury topnienia T_m DNA przeprowadzano wykonując pomiar OD przy 260 nm w ogrzewanych kiuwetach kwarcowych wobec standardowego roztworu SSC i SSC 10-krotnie rozcieńczonego. Ilość GC w DNA obliczono wg wzoru:

$$GC = (T_m - 69,3) \times 2,44 \text{ dla DNA w SSC,}$$

$$GC = (T_m - 53,9) \times 2,44 \text{ dla DNA w SSC 10-krotnie rozcieńczonym (12).}$$

Metoda brominacji. Reakcję przeprowadzano w oparciu o metodę opisaną przez Wanga (17). Próbkę DNA dializowano przez całą noc wobec wody destylowanej. Następnie DNA rozcieńczano 1 N H_2SO_4 tak, aby gęstość optyczna przy 260 nm wynosiła 0,4—0,8. Wodne 1 mM roztwory dezoksyrybonukleotydów (Sigma) rozcieńczono 1 N H_2SO_4 do stężenia 0,05 mM i użyto je jako wzorce. Zmierzono OD roztworów wzorcowych i preparatów DNA przy 270 i 360 nm wobec 1 N H_2SO_4 . Różnicę $OD_{270} - OD_{360}$ oznaczono jako ODB. Następnie do próbek odmierzono po 3 ml każdej z próbek DNA i dodano po 0,1 ml 6 mM wodnego roztworu N-bromoacetamidu (NBA). Do kontroli zawierającej 1 N H_2SO_4 dodano 0,075 ml NBA. Po 2 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono gęstość optyczną przy 270 i 360 nm. Różnicę $OD_{270} - OD_{360}$ oznaczono jako ODA. Zawartość AT w badanym materiale obliczono wg wzoru:

$$P = \frac{100x(ODA_A + ODA_T) + (100-x)(ODA_G + ODA_C)}{x(ODB_A + ODB_T) + (100-x)(ODB_G + ODB_C)}$$

gdzie $x = \%AT$, $P = \frac{ODA}{ODB} \times 100$.

Hydroliza DNA i chromatografia bibułowa. 2,5 mg zliofilizowanego DNA zawieszano w 0,05 ml 12 N $HClO_4$. Hydrolizę prowadzono w 100°C przez 60 min. (2). Następnie rozcieńczano próbkę wodą redestylowaną do objętości 0,5 ml i odwirowywano od brunatnych pozostałości. Klarowny hydrolizat DNA w ilości 20—40 ml nanoszono na bibułę Whatmana nr 1 o wymiarach 18×50 cm. Jako wzorce użyto 4 zasady: A, G, C, T w stężeniach 2 mg/ml 1,2 N $HClO_4$ które nanoszono na bibułę w postaci mieszanin zasad w różnych stosunkach ilościowych. Chromatogram rozwijano 25 godz. w 2 N HCl w mieszaninie izopropanol—woda (65:35) (2). Zidentyfikowano poszczególne zasady, obliczając współczynniki migracji (R_f i R_T) dla otrzymanych plam. Rozdzielone zasady wyeluowano z bibuły 0,1 N HCl i spektrofotometrycznie określono ich stężenia. Na podstawie molarnych ekstynkcji zasad przy charakterystycznych dla nich długościach fal obliczono procentową zawartość zasady w badanym DNA wg wzoru: molarność = $\frac{OD}{\epsilon}$, gdzie OD = gęstość optyczna dla λ_{max} , ϵ = molarna ekstynkcja (2).

Wszystkie pomiary spektrofotometryczne w powyższych metodach wykonywano na spektrofotometrze UV-Vis Varian Techtron Model 635.

WYNIKI I Dyskusja

Przeprowadzona analiza widmowa otrzymanych preparatów DNA wskazuje na wysoki stopień ich oczyszczenia (tab. 1, ryc. 1, 2 i 3).

Zawartość AT i GC w badanych preparatach DNA, wyznaczona metodą depurynacji i reakcji z N-bromoacetamidem, jest zgodna z danymi przedstawionymi w literaturze (10, 17) i wynosi 71% GC i 28% AT w DNA *M. lysodeikticus* oraz ok. 40% GC i 59% AT w DNA grasiczym. Procentowy skład DNA bakterii patogennej dla ameb określony tymi metodami przedstawia się następująco: 46% GC i 56% AT (tab. 2 i 3, ryc. 1, 2 i 3).

Tab. 1. Analiza widmowa badanych preparatów DNA
Analysis of UV absorbance profiles of DNA samples

Źródło DNA DNA source	OD ₂₃₀ /OD ₂₆₀	OD ₂₈₀ /OD ₂₆₀
Bakteria patogenna dla ameb <i>Bacterium pathogenic for amoebae</i>	0,45	0,52
<i>M. lysodeikticus</i>	0,47	0,57
Grasica cielęca Calf thymus	0,36	0,66

Tab. 2. Zawartość GC w badanych preparatach DNA, oznaczona metodą depurynacji
GC content of DNA samples estimated by depurination

Źródło DNA DNA source	OD ₂₆₅ /OD ₂₈₀	X _G	GC %
Bakteria patogenna dla ameb <i>Bacterium pathogenic for amoebae</i>	1,75	0,461	46,1
<i>M. lysodeikticus</i>	1,40	0,710	71,0
Grasica cielęca Calf thymus gland	1,84	0,397	39,7

Tab. 3. Zawartość AT w badanych preparatach DNA, oznaczona metodą brominacji
AT content of DNA samples estimated by bromination

Źródło DNA DNA source	P	AT %
Bakteria patogenna dla ameb <i>Bacterium pathogenic for amoebae</i>	35,50	56,6 [*]
<i>M. lysodeikticus</i>	22,40	28,1 ^{**}
Grasica cielęca Calf thymus gland	36,25	59,0 ^{**}

* Średnia z 2 powtórzeń.

* Mean values of 2 experiments.

** Średnia z 5 powtórzeń.

** Mean values of 5 experiments.

Zawartość AT i GC, oznaczona metodą chromatografii bibułowej hydrolizatu DNA bakterii patogennej dla ameb, wynosi 56,7% AT i 42,3% GC (tab. 4).

Punkt topnienia T_m DNA bakterii patogennej dla ameb i DNA grasiczego wyznaczono w dwóch stężeniach SSC. Nachylenie krzywej T_m zależy od rodzaju anionu silnego elektrolitu obecnego w roztworze, natomiast położenie krzywej T_m w stosunku do osi temperatur zależy od

Tab. 4. Zawartość AT i GC w DNA bakterii patogennej dla ameb, oznaczona metodą chromatografii bibułowej
AT and GC content of bacterial parasite DNA estimated by paper chromatography

Zasada* Base**	Stężenie zasady / μM /* w 0,1 N HCl po elucji z bibuły Base conc. / μM /* in 0,1 N HCl after elution from paper	AT, GC*** %
A	0,0870	56,7
C	0,0638	42,3
G	0,0565	

* Ze względu na niski odzysk, jaki uzyskano podczas elucji tyminy (T) z bibuły, pominięto ją w obliczeniach.

** Średnie z 4 powtórzeń.

*** Średnie z 4 powtórzeń, obliczone na podstawie stężeń A i C oraz A i G.

* Since thymine (T) was not well eluated by 0.1 N HCl from paper its values were omitted in calculations.

** Mean values of 4 experiments.

*** Mean values of 4 experiments calculated from A and C, A and G concentrations.

Tab. 5. Zawartość GC w DNA bakterii patogennej dla ameb obliczona na podstawie temperatury topnienia (T_m)
GC content of DNA of bacterial parasite estimated by melting temperature (T_m)

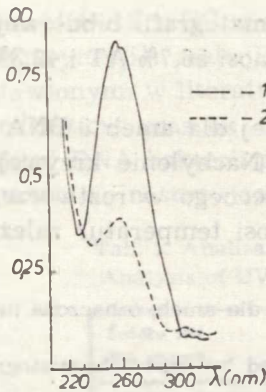
Próbka DNA DNA sample	T_m °C	GC %
DNA w SSC 10 x roso. DNA in 0,1 x SSC	70,7	43,5**
DNA w SSC DNA in 1 x SSC	86,9	43,2**

* Średnia z 2 powtórzeń.

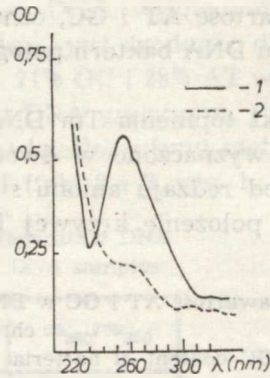
* Mean value of 2 experiments.

** Średnia z 3 powtórzeń.

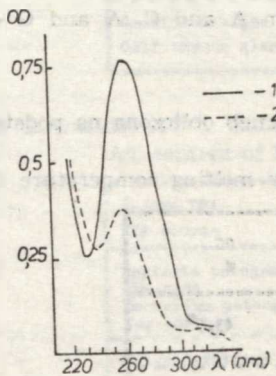
** Mean value of 3 experiments.



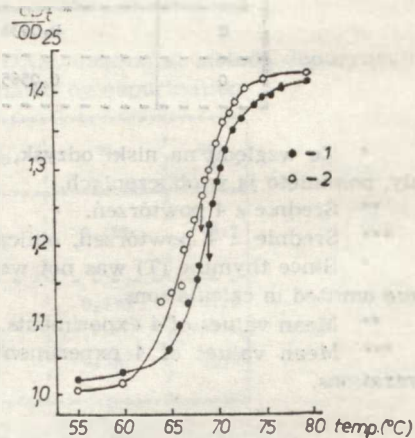
Ryc. 1. Krzywa absorpcji UV DNA bakterii patogennej dla ameb, 1 — przed i 2 — po brominacji
UV absorbance profile of bacterial parasite, 1 — before and 2 — after bromination



Ryc. 2. Krzywa absorpcji UV DNA *M. lysodeikticus*, 1 — przed i 2 — po brominacji
UV absorbance profile of *M. lysodeikticus* DNA, 1 — before and 2 — after bromination



Ryc. 3. Krzywa absorpcji UV DNA grasiczego, 1 — przed i 2 — po brominacji
UV absorbance profile of calf thymus DNA, 1 — before and 2 — after bromination



Ryc. 4. Temperatura topnienia (T_m), 1 — DNA bakterii patogennej dla ameb i 2 — DNA grasiczego w SSC 10-krotnie rozcieńczonym

Thermal denaturation curves (T_m), 1 — T_m of bacterial parasite DNA and 2 — T_m of calf thymus DNA in 0.1×SSC

• Wartość $\frac{OD_t}{OD_{25}}$ z uwzględnieniem poprawki na rozszerzalność termiczną wody (12).

• Value $\frac{OD_t}{OD_{25}}$ corrected for thermal expansion of water (12).

siły jonowej roztworu oraz od wielkości i wartościowości kationu. W związku z tym do wartości T_m uzyskanej dla DNA w 10-krotnie rozcieńczonym roztworze SSC dodano wyznaczoną doświadczalnie wartość 15,4 (12). Ponieważ wartość T_m uzyskana dla DNA grasiczego różniła się o $2,8^\circ$ od temperatury topnienia tego DNA podanej w literaturze (12), różnica ta została uwzględniona w odniesieniu do pomiarów wykonanych na spektrofotometrze Varian Techtron. Ilość GC, określona tą metodą dla DNA bakterii patogenicznej dla ameb, wynosi średnio 43,3% (tab. 5, ryc. 4).

Procentowa zawartość par zasad w DNA bakterii patogenicznej dla ameb, obliczona jako średnia oznaczeń wykonanych czterema różnymi metodami, wynosi 56,5% AT i 43% GC. DNA bakterii patogenicznej dla ameb ma zawartość GC zbliżoną do endosymbiontów *Paramecium caudatum*, w których DNA % GC wynosi od 33 dla μ do 49 dla λ (14). Organizmy te wykazują pod tym względem podobieństwo do niektórych tlenowych drobnoustrojów z rodzaju *Flavobacterium* i *Proteus* (14). Istnieje pewne ich podobieństwo również do form wewnątrzkomórkowych bytujących w organizmach kręgowców i stawonogów — zawartość GC dla rodzaju *Rickettsia* waha się w granicach 30—45% i zbliżona jest do zawartości GC w DNA *Caedobacter* (16). Wartości GC, uzyskane dla DNA obligatoryjnego pasożyta ameb, są również zbliżone do wartości GC określonej dla DNA *Legionella pneumophila* (39% GC) (2), patogenicznej dla człowieka gramujemnej pałeczki, której wektorami przenoszącymi mogą być ameba, a wśród nich *Acanthamoeba castellanii* (15).

PIŚMIENNICTWO

1. Band R. N.: Nutritional and Related Biological Studies on the Free-living Soil Amoeba *Hartmanella rhysodes*. J. Gen. Microbiol. **21**, 80—85 (1959).
2. Bendich A.: Methods for Characterization of Nucleic Acids by Base Composition. Methods in Enzymology. Ed. L. Grossman, K. Moldave. Acad. Press, New York 1957, **3**, 715—723.
3. Brenner D. J., Steigerwalt A. G., M'cDade F. E.: Classification of the Legionnaires Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family Legionellaceae familia nova. Ann. Internal Med. **90**, 656—658 (1979).
4. Drożański W.: Fatal Bacterial Infection in Soil Amoebae. Acta Microbiol. Polon. **5**, 315—317 (1956).
5. Drożański W.: Studies of Intracellular Parasites of Free-Living Amoebae. Acta Microbiol. Polon. **12**, 3—8 (1963).
6. Drożański W.: Axenic Culture of Free-Living Amoebae. I. Culturing of Amoebae on Dead Bacteria, in Water Extract Bacteria and on Peptone Medium. Acta Microbiol. Polon. **12**, 281—292 (1963).
7. Drożański W.: The *in vitro* Experiments on the Fatal Infection of Amoebida by Pathogenic Bacterium. Acta Protozool. **10**, 275—284 (1972).

8. Drożański W., Chmielewski T.: Electron Microscopic Studies of *Acanthamoeba castellanii* Infected with Obligate Intracellular Bacterial Parasite. *Acta Microbiol. Polon.* **28**, 123—133 (1979).
9. Dulaney T. J., Touster O.: Isolation of Deoxyribonuclease II of Rat Liver Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 1424—1431 (1972).
10. Huang P. C., Rosenberg E.: Determination of DNA Base Composition via Depurination. *Analytical Biochem.* **16**, 107—113 (1966).
11. Lowry O. H., Rosenbrough K. J., Farr A. L., Randall R. J.: Proteins Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 536—543 (1951).
12. Mandel M., Marmur J.: Use of Ultraviolet Absorbance — Temperature Profile for Determining the Guanine Plus Cytosine Content of DNA. *Methods in Enzymology*. Ed. L. Grossman, K. Moldave. Acad. Press, New York 1968, **12**, 195—206.
13. Marmur J.: A Procedure for the Isolation Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *Methods in Enzymology*. Ed. L. Grossman, K. Moldave. Acad. Press, New York 1968, **6**, 726—738.
14. Preer J. R., Preer L. B., Jurand A.: Kappa and Other Endosymbionts in *Paramecium aurelia*. *Bact. Review* **38**, 113—176 (1974).
15. Rowbotham T. J.: Preliminary Report on the Pathogenicity of *Legionella pneumophila* for Freshwater and Soil *Amoebae*. *J. Clin. Pathol.* **33**, 1179—1183 (1980).
16. Tyeryar F. T., Bozeman F. M., Ormsbee J.: DNA Base Composition of Rickettsiae. *Science* **180**, 415—417 (1973).
17. Wang S. Y., Hashagen R.: The Determination of Base Composition of Deoxyribonucleic Acids by Bromination. *J. Mol. Biol.* **8**, 333—340 (1974).

РЕЗЮМЕ

Определяли состав щелочей ДНК патогенной для амёб бактерии, выделенной в 1956 г. Дрожаньским. Применены методы депуринации, хроматографии кислотного гидролизата ДНК, реакции с N-бромацатамидом и определение температуры плавления ДНК. Установлено, что в ДНК этого облигатного внутриклеточного паразита около 43% составляет ГЦ, около 57% — АТ.

SUMMARY

The DNA base composition from the bacterium pathogenic for amoebae (Drożański, 1956) was assayed. Depurination, bromination, ultraviolet absorbance — temperature profile and paper chromatography of acid hydrolyzates were used for determination of DNA base composition. It was found that DNA of this obligate intracellular bacterial parasite contained about 43% guanine plus cytosine and 57% adenine plus thymine.