

EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* EN DIFERENTES FASES DE CRECIMIENTO

M. Y. Cortés L, F. J. Vargas P. J. E. Pinilla C, G. Pérez G. y Y. N. de Navarro*.

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490 Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum*, plasmid, DNA.

RESUMEN

Se realizó una comparación simultánea de cuatro métodos para la extracción de ADN plasmídico. De los resultados experimentales se concluyó que únicamente con la técnica de Kronstad, en las condiciones ensayadas y con cultivos de cepas de *Rhizobium leguminosarum bv Viceae* en fase de crecimiento logarítmica temprana, se visualizaron 3 plásmidos para la cepa SEMIA 335 y un plásmido para la cepa B.

ABSTRACT

Four methods for extracting plasmid DNA were compared. The Kronstad technique under the assayed experimental conditions was the only one that allowed the obtention of plasmids. DNA was isolated from two strains of *Rhizobium leguminosarum bv viceae* when the strains were grown to early logarithmic phase. The strain SEMIA 335 yielded three plasmids and strain B yielded one plasmid.

INTRODUCCION

La mayoría de las técnicas reportadas para efectuar la lisis celular de *Rhizobium*, aconsejan un crecimiento bacteriano en fase estacionaria temprana, con un valor de densidad óptica a 540 nm. de aproximadamente 0.8 - 1.0 (1,2,3,4,5,). En esta fase los cultivos de *Rhizobium* se observan densos y de apariencia gomosa, debido a que estas bacterias son productoras de gran cantidad de lipopolisacáridos (LPS), fibrillas de celulosa, polisacáridos

capsulares neutros (CPS), β -1,2 glucanos cílicos y polisacáridos extracelulares aniónicos de alto peso molecular (EPS). Esos polisacáridos pueden encontrarse en la pared celular, o ser secretados en el medio (6) y como lo anotan Ohno y Morrison (7) dificultan la lisis celular e interfieren en el aislamiento del ADN plasmídico.

En diferentes cepas de *Rhizobium* se han detectado plásmidos de gran tamaño (Megaplásmidos) con pesos moleculares que oscilan entre 90 y 300 MDa. (8).

Por la presencia de megaplásmidos en la mayoría de los *Rhizobium*, su susceptibilidad al ataque por DNAsas y su sensibilidad a la ruptura mecánica, se debe seleccionar una metodología de extracción que garantice la conservación de los mismos.

Cada una de las metodologías empleadas tiene diferentes fundamentos. Para la lisis celular se emplean detergentes iónicos como el Sarkosyl y el SDS, seguido de tratamientos a pH básico (9,10,11,12). También se han empleado tratamientos enzimáticos con RNasa (13), Pronasa (1), Lisozima-Pronasa (4).

Una vez lisada la bacteria el ADN cromosómico y plasmídico, se llevan a un pH alcalino (mayor de 12) y luego de un tiempo, el pH se lleva a 8.5-9.0 de manera que el ADN plasmídico se renaturalice. El ADN que permanece soluble (plasmídico principalmente) es luego precipitado selectivamente con polietilenglicol (PEG) 6000-8000.

Cuando en nuestro laboratorio se ensayaron estas condiciones de extracción del ADN plasmídico a partir de cultivos en fase estacionaria, obtuvimos resultados infructuosos; por esta razón en este trabajo se estudió la incidencia de la fase de crecimiento bacterial en la extracción y detección de plásmidos. Para ello se realizó la lisis en etapas de crecimiento comprendidas entre la fase logarítmica temprana hasta la fase estacionaria tardía (turbidez (T) a 540 nm = 0.2-0.9).

Para la extracción del ADN plasmídico se ensayaron las siguientes técnicas: Hirsch et al (1), Meade et al (4), Kronstad et al (11) y Maniatis et al (12); de las cuales la técnica de Kronstad et al (11) nos permitió la mejor extracción y visualización de los plásmidos. Además la técnica seleccionada es sencilla, poco costosa y utilizada especialmente en el aislamiento de megaplásmidos.

Se utilizó la cepa B de *Rhizobium leguminosarum* biovar *Viceae* (*R. leg.*). aislada en nuestro laboratorio cuya infectividad y efectividad ha sido bien establecida (13) y la SEMIA 335.

PARTE EXPERIMENTAL

Bacterias, plásmidos, medios y condiciones de crecimiento..

En la tabla 1 se presentan las bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo. Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron en medio YEM (Manitol - Extracto de levadura), a 28 °C, 100 osc/min, durante 36,50 y 72 horas de acuerdo con la fase de crecimiento.

Para determinar las curvas de crecimiento se efectuaron lecturas de turbidez a 540 nm cada 4 horas (13).

Tabla 1.

BACTERIAS Y PLASMIDOS		
CEPAS O PLASMIDOS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	FUENTE O REFERENCIA
<i>R.leguminosarum</i> biovar <i>Viceae</i> . SEMA 335	Simbióticamente efectiva. Nod ⁺ Fix ⁺	Departamento de Química U. Nacional de Colombia.
<i>Cepa B.</i>	Simbióticamente efectiva. Nod ⁺ Fix ⁺	Departamento de Química U. Nacional de Colombia. Labora- torio de Bioquímica.
<i>E. Coli</i> V.517 VFC 201		Instituto de Biotecnolo- gía U. Nacional de Colombia.
Plásmidos pVA 517	A. 32,04 MDa B. 5,19 MDa C. 3,48 MDa D. 3,03 MDa E. 2,24 MDa F. 1,69 MDa G. 1,51 MDa H. 1,24 MDa	
pVFC 201	A. 80,0 MDa	

La cepa de *E. coli* V517 se cultivó en medio LB (Tryptona-extracto de levadura) y las condiciones de crecimiento son las descritas por Kado y Lui (3) y Maniatis et al (12).

Métodos de extracción de ADN plasmídico:

Las técnicas ensayadas para aislar el ADN fueron las siguientes: Hirsch et al (1), Meade et al (4), Kronstad et al (11) y Maniatis et al (12) con algunas modificaciones.

En la técnica de Hirsch et al (1) se incrementó el tiempo de incubación enzimática con pronasa (5 mg/ml) de 1 a 2 horas. En la técnica de Maniatis et al (12) se varió la concentración de lisozima de 2mg/ml a 5mg/ml, al igual que el tiempo de incubación de 10 minutos a 2 horas para una lisis celular mas efectiva; además se utilizó isopropanol como agente precipitante a 4 °C durante toda la noche.

En Meade et al (4) se reemplazó el Sarkosyl por el SDS, para la lisis celular el tiempo se incrementó en una hora y el ADN se concentró con isopropanol a 4 °C durante toda la noche.

Para llevar a cabo la lisis celular en estos tres métodos se utilizaron 500 ml de cultivo con una densidad de población del orden de 10^8 células/ml en fase estacionaria.

Para el aislamiento del ADN plasmídico en diferentes fases de crecimiento se utilizó la técnica de Kronstad et al (11) de acuerdo con el esquema 1. Se partió de 250 ml de medio de cultivo en diferentes etapas de crecimiento ($T_{540\text{ nm}}$ de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.9). Además se ensayaron dos condiciones de pH para la lisis alcalina (pH 12.4 y 12.8).

Electroforesis:

Las muestras extraídas fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Se corrieron en una cámara horizontal a 75 voltios en Buffer TBE 0.5X (12) durante 3 horas. Se tiñeron con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con luz UV (366 nm) y se fotografiaron empleando una cámara Polaroid película 667 y Cannon-película Kodak 100.

Esquema 1.

TECNICA DE KRONSTAD et al

CULTIVO

(250 ml T_{540 nm} 0.2 a 0,9 - a 100 osc/min. 28 °C)

LISIS CELULAR

(Solución de SDS 10%-NaOH 0.085 M en TE 50/20 mM pH 8.0)

DESNATURALIZACION ALCALINA

(pH final 12.4 y 12.8 por 30 min a temperatura ambiente)

RENATURALIZACION

(Adición Tris HCl 2M pH 7 hasta pH 8.5)

PRECIPITACION

(Adición NaCl 5M., dejar toda la noche a 4°C centrifugar 11.000 rpm, 15 minutos a 4°C.).

Precipitado
se desecha

SOBRENADANTE

PURIFICACION

(Adición de *PEG-6000 50% P/V dejar mínimo 3h a 4°C
centrifugar 11.000 rpm 15 min, 4°C.)

Sobrenadante
se desecha

PRECIPITADO

(Adición TE 10/1 mM pH 8.0 RNasa 50 ug/mL.)

Lavados con Fenol-Cloroformo.

Precipitación con ACONa Concentración final 0.3
M/EtOH. 2 vol.

ELECTROFORESIS

Buffer TBE 0.5X 75V, 3h.

* Polietilenglicol 6000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de Crecimiento:

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento en medio YEM determinadas para las cepas de *R. leg* SEMIA 335 y B. Se observó la fase de latencia en un intervalo hasta 16 h de cultivo, luego se alcanzó la fase media logarítmica entre las 32 y 37 y la fase estacionaria temprana, se obtuvo entre las 50 y 55 h.

Métodos de extracción de ADN plasmídico

La técnica de Meade et al (4) combina la acción de dos enzimas proteolíticas (lisozima y pronasa) junto con un detergente polar el cual produce una lisis completa. Se conoce que las bacterias de género *Rhizobium* son productoras de lipopolisacáridos, peptidoglucanos y gomas, actuando los primeros como inhibidores no competitivos frente a la lisozima proveniente de diferentes fuentes animales (7).

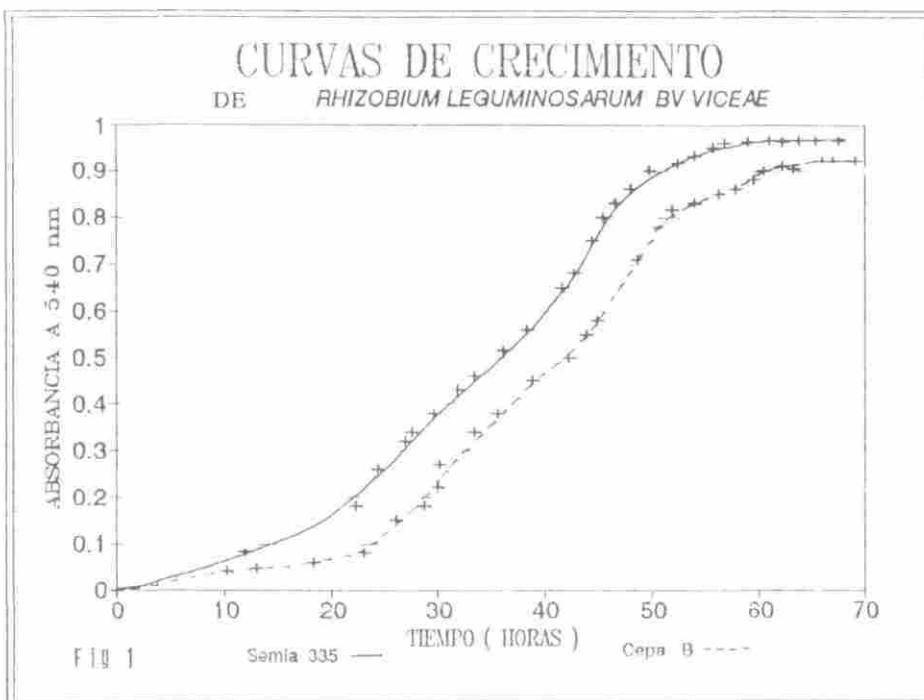


Figura 1.

Con el fin de mejorar la lisis, las células fueron prelavadas con buffer TE y sometidas a un choque osmótico para facilitar la acción de la lisozima. El pellet celular se lavó además con acetona para facilitar la extracción de ADN total. Sin embargo el empleo de esta técnica con las modificaciones descritas, no permitió visualizar electroforéticamente el ADN plasmídico. Tampoco se logró separarlo en ensayos de ultracentrifugación en gradiente de densidad con CsCl en bromuro de etidio.

El comportamiento electroforético de las preparaciones obtenidas con las cepas B y 335 de acuerdo con Maniatis et al (12) permitió observar una banda ancha cerca al centro del gel ,correspondiente al ADN linearizado (cromosómico y plasmídico). Este resultado fue repetitivo y posiblemente se debió a dos factores: a) la lisis con la mezcla de TritonX-100 - lisozima no fue completa y tanto el plásmido como el cromosoma y residuos de pared celular quedaron como precipitados y b) la cantidad de células tomadas para la lisis fue muy baja para poder visualizar los plásmidos. Cada uno de los pasos en la técnica se controló electroforéticamente, no detectando plásmidos en ninguno de ellos.

La técnica de Hirsch et al (1) ha sido especialmente utilizada para aislar megaplásmidos en *R. leg* ; por ello fue una de las seleccionadas para llevar a cabo la lisis celular. En los resultados electroforéticos obtenidos con esta técnica para los lisados crudos de ADN de las cepas estudiadas ($T_{540\text{ nm}} = 0.8$) se observó un efecto de barrido ,que correspondió a ADN desnaturizado o posiblemente a interferencia de proteínas u otras substancias presentes en alta concentración y las cuales no fueron totalmente eliminadas del lisado, en las condiciones de trabajo utilizadas. Este método involucró un buen número de pasos en los cuales el ADN se puede degradar; es así como para alcanzar y medir los valores de pH en la desnaturalización y renaturalización, se hizo necesaria la agitación debido a la alta viscosidad del medio. Además si no se logra ajustar el pH adecuadamente, el ADN no podría ser recuperado, ya que la desnaturalización sería irreversible.

ADN plasmídico de *R. leg* cepas SEMIA 335 y B por el método de Krosntad et al (11).

Los dos valores de pH ensayados para la solución de lisis alcalina nos permitieron la extracción de ADN plasmídico. Cabe anotar que cuando se utilizó un pH 12,8 siempre se obtuvo un lisado claro.

Para detectar la presencia del ADN plasmídico en diversas etapas del esquema 1 se tomaron dos muestras, una del lisado original (luego de la desnaturalización-renaturalización) y otra de la solución antes de la preci-

pitación con PEG 6000 (50%). En la electroforesis se encontró que en las dos preparaciones estaba presente el ADN plasmídico y que este no se encontraba ni en el precipitado de NaCl ni en el sobrenadante después de precipitar con PEG.

La figura 2 muestra las bandas observadas después de las electroforesis de las preparaciones crudas de plásmidos. Las bandas discretas representan el ADN plasmídico covalente circular cerrado (ccc) de varios tamaños y la

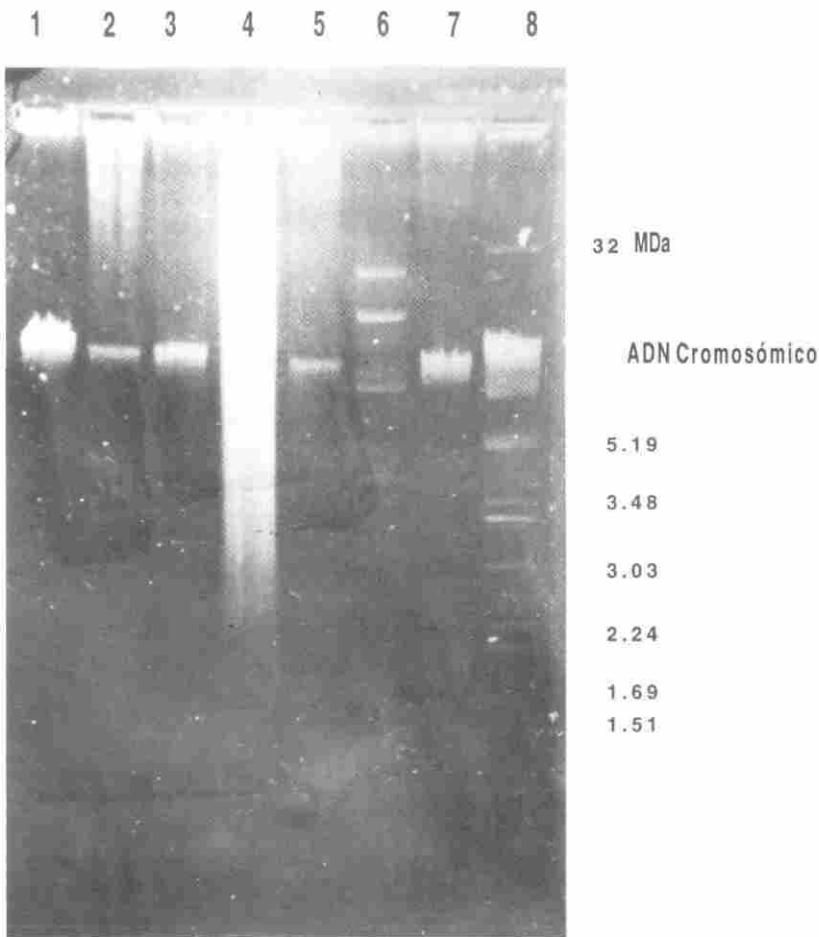


Figura 2.

Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los lisados crudos de las cepas de *R. leg bv viceae* carril 1, pVFC 201 ($T_{540\text{ nm}}$ 0.87). Carriles 2,4 y 6 SEMIA 335 ($T_{540\text{ nm}}$ 0.43, 1.12 y 0.35 respectivamente) carril 8 pVA517, plásmidos de referencia.

banda fluorescente difusa, la cual presentó mayor migración, corresponde a fragmentos de ADN cromosómico. La fluorescencia que se observa bajo la luz U.V contigua a los pozos posiblemente se deba a formas circulares abiertas de plásmidos grandes.

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* como referencia. Los 8 plásmidos de la cepa V517 (carril 8) han sido señalados en la figura 2 y corresponden a las formas abiertas. La cepa VFC 201 (carril 1) presentó únicamente el ADN cromosómico sin que fuera observable el plásmido de 80 MDa.

De acuerdo con el incremento de la turbidez en esta figura se muestra lo siguiente:

En el carril 6 aparece el perfil plasmídico de la SEMIA 335 en fase logarítmica temprana ($T_{540 \text{ nm}} = 0.35$), donde se observaron dos bandas definidas en la parte superior del gel, por encima del ADN cromosómico, que corresponderían a plásmidos de elevado peso molecular y otra banda de mayor migración que puede tratarse de un plásmido más pequeño. Este plásmido se encuentra en una migración electroforética intermedia entre las bandas del pVA 517 de 5.19 MDa y 3.48 MDa (carril 8) que se usó para visualizar el funcionamiento del método.

Además pudo observarse la reducción en intensidad de la banda de ADN cromosómico, en comparación con los métodos que no involucran desnaturalización - renaturalización, debido a que gran parte fue eliminado de la preparación mediante una precipitación selectiva con PEG.

El tamaño exacto de estos plásmidos no fue posible determinarlo, por que en primer lugar no se contaba con un megaplásmido marcador de peso molecular aproximado, y en segundo lugar en *R. leg*, plásmidos con un tamaño entre 10^4 - 10^6 pares de bases, migran en la región comprendida entre el sitio de aplicación y el ADN cromosómico dependiendo también de la forma como se encuentre el ADN.

En los carriles 2 y 4 se observa que para valores de T superiores a 0.4 (0.43 y 1.12 respectivamente) no se visualizaron plásmidos para la SEMIA 335. Con una turbidez de 1.12 (carril 4) se observó un barrido que posiblemente corresponde a ADN degradado o a interferencias de proteínas desnaturadas.

Igualmente en la cepa B no se observaron plásmidos (carriles 3,5,7) cuando los cultivos bacteriales presentaron valores de turbidez superiores a 0.4. La banda característica de ADN cromosómico se apreció en los carriles 2 y 6 para SEMIA 335 y en los carriles 3,5,7 para la cepa B.

Los distintos resultados entre los cultivos con una turbidez de 0.43 y de 0.35 posiblemente se deban a que estos valores corresponden a una diferencia de aproximadamente 7 horas en el crecimiento de la bacteria; en *R. leguminosarum* por ser de crecimiento rápido el tiempo de duplicación es de 7 a 8 horas.

En la figura 3 se muestran nuevamente los resultados de la electroforesis. Cabe destacar la óptima resolución de los 8 plásmidos y el ADN de la cepa VA 517 (carril 3) en el gel de agarosa al 0.7%; mientras que en la preparación de la cepa VFC 201 (carril 1) no se observa el plásmido de 80 MDa.

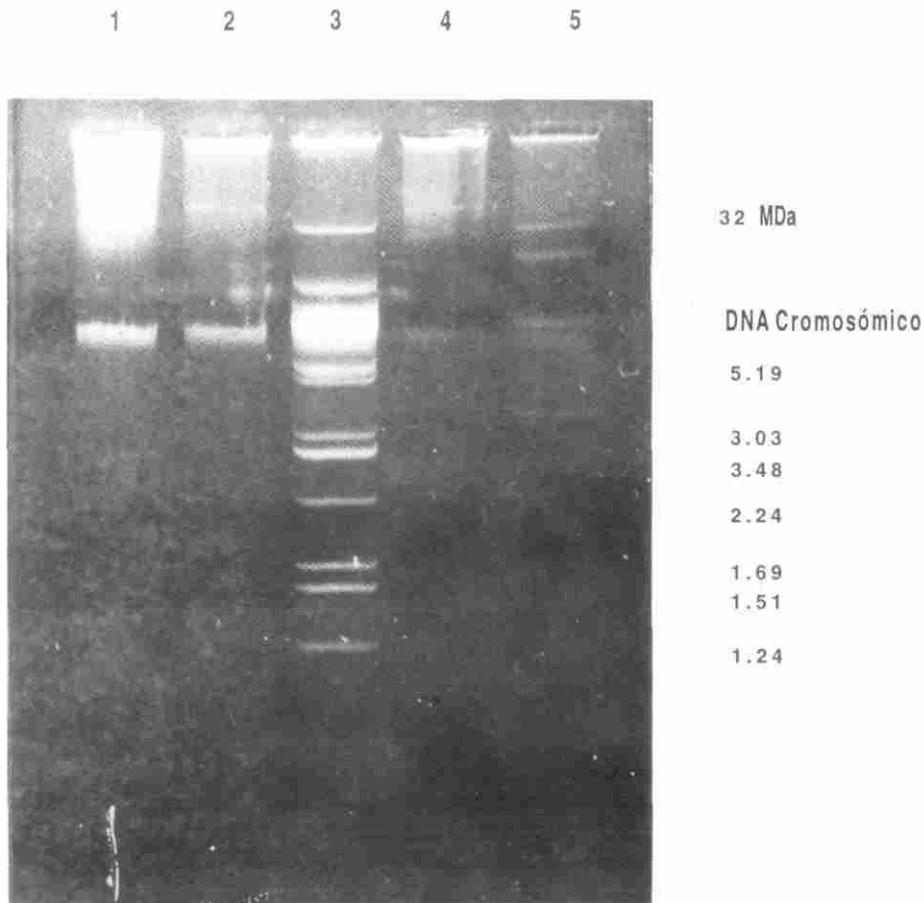


Figura 3.

Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los lisados crudos Carril 1 pVFC 201, Carril 2 cepa B, ($T_{540\text{ nm}}$ 0.3), Carril 3 pVA517 plásmidos de referencia, Carriles 4 y 5 SEMIA 335 ($T_{540\text{ nm}}$ 0.28 y 0.32 respectivamente)

Para la SEMIA 335, con $T_{540\text{ nm}}$ de 0.32 (carril 5) se determinó la presencia de los tres plásmidos mencionados anteriormente. Cuando la preparación alcanzó una turbidez de 0.28 (carril 4) no se visualizaron los plásmidos posiblemente por una baja concentración.

Para la cepa B ,en forma análoga a lo observado en la figura 2 , se detectó un plásmido con menor migración que el ADN cromosómico (carril 2).

Estas determinaciones concuerdan con lo anotado por Martínez et al (8), en su revisión crítica sobre genoma de *Rhizobium* quienes consideran que el número de plásmidos diferentes dentro de una cepa de *Rhizobium* varía entre 1 y 6 y representa un 25% del total del ADN.

Muchos investigadores han trabajado en el aislamiento, caracterización y función en la fijación simbiótica de Nitrógeno de diversos plásmidos en diferentes cepas de *Rhizobium*. Específicamente en *R. leg* Prakash y Atherly (14) reportaron un tamaño de 3.1 MDa para el plásmido pRle1001a150, Hirsch et al (1) detectaron 3 plásmidos en la cepa 300, 2 de los cuales fueron: El pRle 1 JI con un tamaño de 130 MDa y el pRle 4JI con 160 MDa. Además Hynes y Mc Gregor (15) estudiando diferentes cepas de *R. leg* encontraron dos plásmidos fuera del plásmido SYM (plásmido simbiótico), pero no determinaron sus pesos moleculares. Uno de estos plásmidos (pRle VF39C) contiene genes involucrados en la producción de LPS y el otro parece ser importante tanto para el crecimiento de *Rhizobium* como para la fijación de Nitrógeno (15).

Por otra parte Kado y Liu (3) también utilizando electroforesis en geles de agarosa 0.7% detectaron megaplásmidos en especies de *Rhizobium*.

Estos autores reportan que para la cepa 162p17 de *R. trifolii* detectaron dos plásmidos de 350 y 160 MDa ;para *R. leg* 128c53 observaron igualmente dos plásmidos y para *R. japonicum* 3I1634 un plásmido de 110 MDa. En este trabajo también detectaron megaplásmidos para cepas de *Agrobacterium*. Resultados similares han sido descritos por (1, 14,4).

Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que la extracción y detección del ADN plasmídico de *R. leg* SEMIA 335 y cepa B se logra cuando se parte de cultivos en fase de crecimiento logarítmica temprana, con $T_{540\text{ nm}}$ inferior a 0.4 y utilizando la técnica de Kronstad et al (11) en las condiciones descritas.

BIBLIOGRAFIA

1. Hirsch, P. R.; Van Montagu, M.; Johnston, W. B.; Brewin, N. J. Schell, J. *J. Gen. Microbiol.* **1980**. 120, 403-412.
2. Adachi, T. and Iyer, V. N. *Anal. Biochem.* **1980**. 101, 271-274.
3. Kado, C. I. and Lui, S. T. *J. Bacteriol.* **1981**. 145, 1365-1373.
4. Meade, H. M.; Long, S. R.; Ruvkun, G. B.; Brown, S. E.; Ausubel, F. M. *J. Bacteriol.* **1982**. 149, 114-122.
5. Masterson, R. V.; Prakash, R. K.; Atherly A. G. *J. Bacteriol.* **1985**. 163, 21-26.
6. Breedveld, M. W.; Canter Cremers, H. C. J.; Batley, M.; Zevenhuizen; L. P. T. M.; Wijffelman, C. A.; Posthumus, M. A.; Zehnder, A. J. B. *J. Bacteriol.* **1993**. 175, 750-757.
7. Ohno, N.; Morrison, D. C. *J. Biol. Chem.* **1988**. 264, 4434-4441.
8. Martínez, E.; Romero, D.; Palacios, R. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1990**. 9, 59-93.
9. Nuti, M. P.; Lederboer, A. M.; Lepidi, A. A.; Schilperoort, R. A. *J. Gen. Microbiol.* **1977**. 100, 241-248.
10. Casse, F.; Boucher, C.; Julliot, J. S.; Michel, M.; Denarie, J. *J. Gen. Microbiol.* **1979**. 113, 229-242.
11. Kronstad, J. W.; Schnepf, H. E.; Withey, H. R. *J. Bacteriol.* **1983**. 154, 419-428.
12. Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. **1989**.
13. De Navarro, Y.; Perez G. *Rev. Col. Quím.* **1990**. 19, 35-50.
14. Prakash, R. K.; Atherly, A. G. *Rev. Cytol.* **1986**. 104, 1-24.
15. Hynes, M. F.; Mc Gregor, N. F. *Mol. Microbiol.* **1990**. 4, 567-574.