



acta científica venezolana

ASOCIACION VENEZOLANA PARA EL AVANCE DE LA CIENCIA

primer simposio internacional sobre hipertensión arterial

Parque Central

1 - 3 de Septiembre 1976

Caracas - Venezuela

Mapeo del Gen *chlE* en *Escherichia Coli* K₁₂

MANUEL DAGERT y JUAN PUIG

Facultad de Ciencias, Grupo de Biología Experimental
Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

El análisis genético de un mutante *chl-r*, realizado mediante conjugación con cepas Hfr de polaridad opuesta y transducción con el fago P₁, prueba la existencia de un gen *chl E* ligado al gen *chl A*, según la secuencia *gal-att λ-bio-chl A-chl-e*.

MAPPING OF THE *chlE* GENE IN *ESCHERICHIA COLI* K₁₂

ABSTRACT

The genetic analysis of a *chl-r* mutant, done by conjugation with Hfr strains of opposed polarity and transduction with phage P₁, prove the existence of a *chl E* gene linked to the *chl A* gene, according to the sequence *gal-att λ-bio-chl A-chl-e*.

INTRODUCCIÓN

Pichinoti¹ ha establecido la existencia de dos Nitrato-Reductasas bacterianas, la enzima A y la enzima B, que se diferencian en muchas de sus propiedades y, principalmente, en su comportamiento con respecto a un análogo estructural del nitrato, el clorato. Este es un sustrato de la enzima A y un inhibidor de la enzima B.

Una enterobacteria que posee la Nitrato-Reductasa A, no puede crecer en anaerobiosis en presencia de ClO₃⁻, ya que el clorito formado (o productos ulteriores de reducción de este compuesto) es letal para ella.² Esto ha permitido aislar mutantes que han perdido las actividades ligadas a la enzima A, sembrando en profundidad en agar nutritivo glucosado que contiene KClO₃.

Los estudios realizados por Puig y col.³ y por Adahya y col.⁴ han permitido agrupar a los mutantes *chl-r* en 5 clases: *chl A*, *chl B*, *chl C*, *chl D* y *chl E*. Los mutantes *chl A*, *chl B*, *chl D* y *chl E* son pleiotropos, porque son defectivos a la vez para las actividades Nitrato-Reductasa e Hidrogenliasa, mientras que los mutantes *chl C* están desprovistos solamente de la actividad Nitrato-Reductasa.

En *E. coli* K₁₂, las mutaciones *chl A*, *chl D* y *chl E* están ligadas a la

región *gal*, las *chl B* a *mtl* y las *chl C* a *trp*.

Las experiencias realizadas e incluidas en el presente trabajo, nos han permitido precisar la ubicación del gen *chl E* en el mapa cromosómico de *E. coli* K₁₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los experimentos utilizamos medio rico, medio mínimo de Davis,⁵ medio E. M. B., medio L de Lennox⁶ y medio completo con glucosa en tubos Durham para la producción de H₂.

Para dosar la actividad Nitrato Reductasa, se utilizó el método de Lester y De Moss⁷ modificado.

El mapeo del gen *chl E* se efectuó mediante técnicas de conjugación⁸ y transducción con el fago P₁.⁶

Las cepas de *E. coli* K₁₂ y sus características están incluidas en la tabla I, señalándose la polaridad de las Hfr en la figura 1.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Actividad enzimática

La actividad Nitrato-Reductasa correspondiente a la cepa 356 se estimó en 154 μ moles de nitrato reducidos/hora/mg de proteínas.

Por otra parte, la cepa 356-30 no mostró actividad Nitrato-Reductasa estimable mediante el método ya mencionado.

Conjugaciones

El carácter *chl*⁺ no es transmitido a los recombinantes *mal*⁺ cuando la F⁻ 356-30 es cruzada con la Hfr P4X.

Además, al realizar cruces de la misma F⁻ con cepas Hfr de polaridad opuesta, HfrW20 o HfrH, se observa una transferencia del alelo *chl*⁺ junto con el marcador *gal*⁺. Al efectuar el cruce con la HfrH, interrumpiendo la conjugación a los 25 minutos, se obtienen de nuevo recombinantes *gal*⁺ *chl*⁺.

Transducciones

Con la finalidad de precisar la ubicación del gen *chl*₃₀ en el mapa del cromosoma de *E. coli* K₁₂, se realizaron cuatro experiencias de transducción que se reseñan a continuación:

1. Las frecuencias de cotransducción para los alelos *chl*₃₀⁻ y *chl*₁₅⁻ con respecto a *gal* se muestran en la Tabla II.
2. Transducciones recíprocas entre las cepas *gal*⁺ *chl*₃₀⁻ y *gal*⁻ *chl*₁₅⁻ por una parte, y entre las cepas *gal*⁺ *chl*₁₅⁻ y *gal*⁻ *chl*₃₀⁻ por la otra, dieron los resultados incluidos en la Tabla III.
3. Los resultados de experiencias de cotransducción, utilizando cepas λ lisogénicas se muestran en la Tabla IV.
4. Por último, se realizaron ensayos de cotransducción que incluyen al marcador *bio*, orientados a corroborar la ubicación del gen *chl*₃₀⁻ con respecto a los otros marcadores de la región *gal*. Los resultados están incluidos en la Tabla V.

DISCUSIÓN

Los resultados de las experiencias de conjugación permiten concluir que la mutación *chl*₃₀ está ubicada cerca de la región *gal* del cromosoma de *E. coli* K₁₂.

La frecuencia de cotransducción de *chl*₃₀ con *gal* difiere bastante de la obtenida para *chl*₁₅. La mutación *chl*₁₅ corresponde al gen *chl A* mapeado por Puig y col.,⁹ y los resul-

TABLA I

Cepas de *E. coli* K₁₂ utilizadas y sus características

Cepa Nº	Polaridad	GENOTIPO	ORIGEN
303	Hfr P ₄ X	met ⁻	Instituto Pasteur
322	Hfr H	B ₁ ⁻	Instituto Pasteur
356	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ arg ⁻ pro ⁻ ade ⁻ lac ⁻ gal b str ^{-r} T ₁ ^{-r} (λ) ⁻	Instituto Pasteur
356-15	F ⁻	chl A, thr ⁻ , leu ⁻ B ₁ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ lac y gal b, str ^{-r} T ₁ ^{-r} , (λ) ⁻	Aislamiento chl-r Nº 15 a partir de la 356
356-30	F ⁻	chl A, thr ⁻ , leu ⁻ B ₁ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ , lac y gal b, str ^{-r} T ₁ ^{-r} (λ) ⁻	Aislamiento chl-r Nº 30 a partir de la 356
398	Hfr W20	B ₁ ⁻ , glu ⁻ , Pyr ⁻	Instituto Pasteur
452	Hfr H	B ₁ ⁻ , (λ) ⁺	322 (λ) ⁺
487	F ⁻	chl A, his ⁻ , ade ⁻ , lac ⁻ , met ⁻ , gal ⁻ , str ^{-r} , (λ) ⁺	382 mal ⁺ (λ) ⁺
504	F ⁻	chl ⁻ , thr ⁻ , leu ⁻ , B ₁ ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ ,	356-30 gal ⁺
594	F ⁻	chlA ⁻ , thr ⁻ , leu ⁻ , thi ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ , lac y, gal b, rec, λ-r, str-r	356-15 rec ⁻
VE716	F ⁻	chl A, thr ⁻ , leu ⁻ , B ₁ ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ , lac ⁻ , str-r	356-15 gal ⁺
VE718	F ⁻	chl A, thr ⁻ , leu ⁻ , B ₁ ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ , lac ⁻ , str-r	VE 716 gal ⁺ (λ) ⁺
VE719	F ⁻	chl A, thr ⁻ , leu ⁻ , B ₁ , arg ⁻ , pro ⁻ , ade ⁻ , lac y ⁻ gal b, str-r T ₁ -r (λ) ⁺	356-30 (λ) ⁺

TABLA II

Frecuencias de cotransducción del gen chl con el gen gal

Genotipo de cepas donadoras		Genotipo de cepas receptoras		Número de transductantes gal ⁺	Número de chl entre las gal ⁺		%
gal ⁺	chl ⁺	gal ⁻	chl ₃₀ ⁻		chl ⁺	chl ⁻	
gal ⁺	chl ⁺	gal ⁻	chl ₃₀ ⁻	331	4	—	1,2
gal ⁺	chl ₃₀ ⁻	gal ⁻	chl ⁺	248	—	3	1,2
gal ⁺	chl ⁺	gal ⁻	chl ₁₅ ⁻	290	67	—	23
gal ⁺	chl ₁₅ ⁻	gal ⁻	chl ⁺	280	—	65	23,3

TABLA III

Frecuencias de transducciones recíprocas chl₃₀⁻ chl₁₅⁻

Genotipo de cepas donadoras		Genotipo de cepas receptoras		Número de transductantes gal ⁺	Número de chl ⁺ entre las gal ⁺	%
gal ⁺	chl ₃₀ ⁻	gal ⁻	chl ₁₅ ⁻			
gal ⁺	chl ₃₀ ⁻	gal ⁻	chl ₁₅ ⁻	329	71	21,4
gal ⁺	chl ₁₅ ⁻	gal ⁻	chl ₃₀ ⁻	522	2	0,4

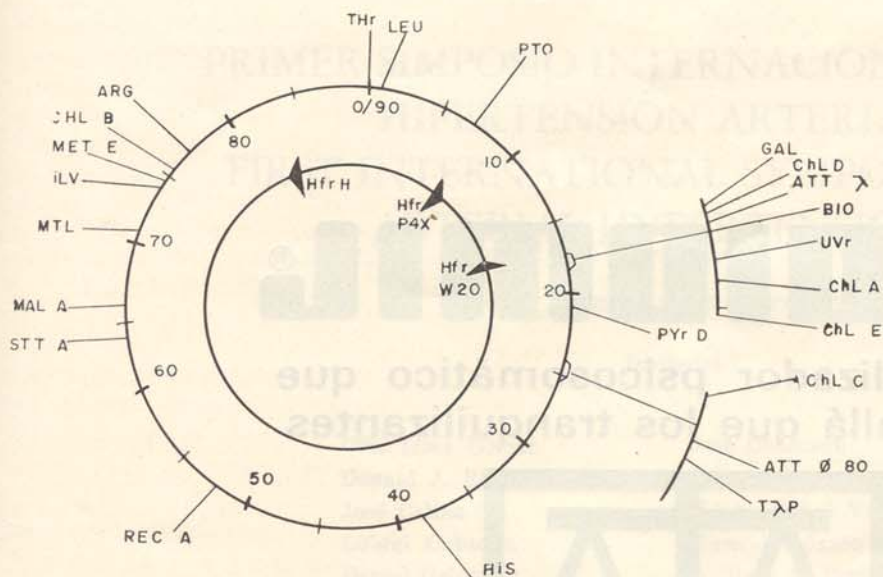


Fig. 1. Mapa cromosómico de *E. coli* K12. La polaridad de las Hfr está señalada con flechas.

TABLA IV

Frecuencias de contranstrucción del gen *chl* con el gen *gal* en cepas λ lisogénicas

Genotipo de cepas donadoras	Genotipo de cepas receptoras	Número de transductantes <i>gal</i> ⁺	Número de <i>chl</i> ⁺ entre las <i>gal</i> ⁺	%
<i>gal</i> ⁺ (λ) ⁺ <i>chl</i> ⁺	<i>gal</i> ⁻ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₃₀ ⁻	406	—	—
<i>gal</i> ⁺ (λ) ⁺ <i>chl</i> ⁺	<i>gal</i> ⁻ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₁₅ ⁻	397	4	1
<i>gal</i> ⁺ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₃₀ ⁻	<i>gal</i> ⁻ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₁₅ ⁻	411	2	0,5
<i>gal</i> ⁺ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₁₅ ⁻	<i>gal</i> ⁻ (λ) ⁺ <i>chl</i> ₃₀ ⁻	285	—	—

TABLA V

Frecuencias de contranstrucción del gen *chl* con el gen *bio*

Genotipo de cepas donadoras	Genotipo de cepas receptoras	Número de transductantes <i>bio</i> ⁺	Número de <i>chl</i> ⁺ entre las <i>bio</i> ⁺	%
<i>bio</i> ⁺ <i>chl</i> ⁺	<i>bio</i> ⁻ <i>chl</i> ₃₀ ⁻	132	9	6,8
<i>bio</i> ⁺ <i>chl</i> ⁺	<i>bio</i> ⁻ <i>chl</i> ₁₅ ⁻	149	108	73

tados indican que la mutación *chl*₃₀ pertenece a una región distinta a la *chl A*. Esto se confirma con los resultados obtenidos para las frecuencias de transducciones recíprocas *chl*₃₀-*chl*₁₅, y además permite postular dos secuencias posibles para los tres marcadores: *gal-chl*₁₅-*chl*₃₀ y *chl*₃₀-*gal-chl*₁₅.

Con la finalidad de determinar la validez de una sola de estas secuencias, se realizaron las experiencias de cotransducción utilizando cepas λ lisogénicas. Considerando que el sitio de unión del fago λ se encuentra entre los marcadores *gal* y *chl*₁₅, es evidente que la secuencia acorde con estos resultados es *gal-chl*₁₅-*chl*₃₀ y no *chl*₃₀-*gal-chl*₁₅. (En este último caso se deberían esperar iguales valores de cotransducción para todos los cruces efectuados).

Por otra parte, las frecuencias de cotransducción de *chl*₃₀ y *chl*₁₅ con *bio*, permiten presentar la secuencia *gal-att* λ -*bio-chl*₁₅-*chl*₃₀ como la única acorde con todos los resultados aquí presentados. La mutación *chl*₃₀ corresponde al gen *chl E* postulado por Puig y col.

REFERENCIAS

- Pichinoty, F.; Bull. Soc. Franc. Physiol. Veg., 12, 97 (1966).
- Piéchaud, M., Pichinoty, F., Azoulay, E., Couchoud-Beaumont, P., Gendre, J.; Ann. Inst. Pasteur, 116, 276 (1969).
- Puig, J., Azoulay, E.; Comptes Rendus, 264, 1916 (1967).
- Adahya, S., Cleary, P., Campbell, A.; Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 856 (1968).
- Davis, B. D.; Experientia, 6, 41 (1950).
- Lennox, E. S.; Virology, 1, 190 (1955).
- Lester, R.; De Moss, J. A. J. of Bacteriol. 105, 1006 (1971).
- Wollman, E., and Jacob. "La sexualité des Bacteries", Masson Ed., Paris.
- Puig, J.; Azoulay, E.; Gendre, J.; Richard, E.; C. R. Acad. Sc. Paris, 268, 183 (1969).