

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 97.358**

**REQUERENTE:** SANOFI, francesa, industrial, com sede em 40 Avenue George V 75008 Paris, França, e SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE, francesa, industrial, com sede em Tour Elf-2 Place de la Coupole, la Défense 6, 92400 Courbevoie França

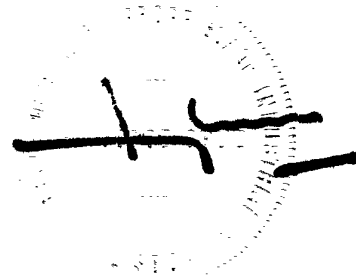
**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA MOLECULA DE ADN E PLASMIDEO COMPREENDENDO PELO MENOS UM MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS FAGOS, BACTÉRIAS CONTENDO-O E SUA UTILIZAÇÃO"

**INVENTORES:** Fabjen Prevots e Paul Ritzenthaler

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

França, 13 de Abril de 1990, No.90 04860

97.257



SANOFI e SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE

"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ADN E PLASMÍDEO COM-  
PREENDENDO PELO MENOS UM MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS FAGOS,  
BACTÉRIAS CONTENDO-O E SUA UTILIZAÇÃO"

=====

### MEMÓRIA DESCRITIVA

#### RESUMO

O presente invento diz respeito a um processo para a obtenção de uma molécula de ADN e plasmídeos que são susceptíveis de estar contidos nos transconjugantes saídos de um cruzamento de uma estirpe dadora escolhida entre as estirpes:

- estirpes de Lactococcus lactis ssp cremoris depositada na CNCM com os nº I-939 e I-943,
  - estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940,
  - estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM com os nº I-941 e I-942,
- e duma estirpe receptora.

Estes plasmídeos são aplicados na obtenção de bactérias lácticas mais resistentes aos fagos.

O processo para a obtenção da referida molécula de ADN consiste em se proceder à selecção das moléculas de ADN que contêm uma parte funcional do fragmento HindIII-HindIII de cerca de 3,3 kb do plasmídeo pPF144-1 presente na estirpe depositada na C.N.C.M. sob o nº I-1070.

O presente invento diz respeito a uma molécula de DNA e plasmídeos susceptíveis de hibridarem com esta, portadores de pelo menos um mecanismo de resistência a fagos, bactérias lácticas contendo esta molécula ou estes plasmídeos, em particular lactococcus pertencentes à espécie Lactococcus lactis, utilização de certas estirpes destes lactococcus para transferir, principalmente por conjugação, um mecanismo de resistência a fagos para estirpes com interesse industrial, em particular na indústria de laticínios e emprego de certas estirpes de lactococcus para obter estes plasmídeos.

As bactérias lácticas estão implicadas na elaboração e conservação de um grande número de produtos alimentares, tais como queijos, manteiga, iogurtes, salsichas ou chocrute. Entre estes os produtos de laticínios ocupam um lugar particularmente importante. A transformação industrial do leite é feita em fermentadores cada vez maiores, nos quais o aparecimento de fagos de bactérias lácticas pode ter consequências graves, ou mesmo catastróficas: variação das características, principalmente organoléticas, do produto final; perda do produto do fermentador e necessidade de descontaminar este último assim como as instalações circundantes. Existe pois na indústria de laticínios uma necessidade imperiosa de novos meios e novos métodos que permitam tornar as bactérias lácticas mais resistentes aos fagos.

O invento diz respeito a uma nova molécula de DNA compreendendo pelo menos um mecanismo de resistência a fagos, caracterizada por ser portadora de uma parte funcional do fragmento HindIII-HindIII com cerca de 3,3 Kb do plasmídeo pPF144-1 presente na estirpe Escherichia coli depositada em 9 de Abril de 1991 na C.N.C.M. com o nº I-1070.

Este fragmento HindIII-HindIII com cerca de 3,3 Kb foi isolado a partir do plasmídeo pPF144 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis, depositada na C.N.C.M. com o número I-945, a qual é um transconjugante derivado do cruzamento da estirpe dadora Lactococcus lactis ssp lactis S91 depositada na C.N.C.M. em 12 de Abril de 1990 com o nº I-940 e a estirpe receptora Lactococcus lactis ssp lactis S45, derivada da estirpe Lactococcus lactis ssp lactis C2-LL. Mc. Kay et al., 1977, J. Bacteriol. 257-265). O fragmento é portador de um ou mais mecanismos de resistência a fagos. Uma parte funcional deste fragmento aqui designada como uma parte deste portadora de pelo menos um mecanismo de resistência aos fagos.

Esta molécula de DNA é um fragmento de DNA linear ou um plasmídeo.

O invento diz assim respeito a um novo plasmídeo compreendendo pelo menos um mecanismo de resistência a fagos caracterizado por ser susceptível de hibridar com a molécula de DNA definida anteriormente e por estar contido em transconjugantes derivados do crescimento de uma estirpe dadora escolhida entre as estirpes que se seguem:

- estirpes de Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM em 12 de Abril de 1990 com os nº I-939 e I-943;
- a estirpe de Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-940;
- as estirpes de Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM em 12 de Abril de 1990 com os nº I-941 e I-942 e uma estirpe receptora.

As estirpes dadoras são resistentes aos fagos ( $Rap^+$ ), capazes de metabolizar a lactose ( $Lac^+$ ) e sensíveis à eritromicina ( $Ery^S$ ) assim como à estreptomicina ( $Str^S$ ). Sabe-se que nos lactococcus a capacidade de metabolizar a lactose é transportada por um plasmídeo não conjugativo, o qual pode ser transferido para uma outra estirpe na forma cointegrada com um outro plasmídeo conjugativo. é portanto cómodo para a selecção dos transconjugantes que a estirpe receptora não seja capaz de metabolizar a lactose ( $Lac^-$ ) e que seja portadora de um gene de resistência a pelo menos um destes antibióticos. Uma estirpe receptora prática é por exemplo a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis S45,  $Lac^-$ ,  $Ery^R$  (plasmídica) e  $Str^R$  (cromossómica), a qual permite fazer a selecção de transconjugantes pela capacidade de metabolizar a lactose e pela resistência à eritromicina, a resistência à estreptomicina servindo para diferenciar as dadoras das receptoras.

Ou os mecanismos de resistência aos fagos transportados por este plasmídeo conferem às estirpes contendo estes uma resistência parcial ou total a uma temperatura de 30°C contra os fagos do grupo I de homologia e contra os fagos do grupo III de homologia, fagos virulentos representativos de todos os susceptíveis de serem encontrados nos acidentes de fermentação (RELAND P. et al., (1987) J. Gen. Microbiol., 133, 3053-3063).

A uma temperatura de 40°C alguns daqueles continuam a conferir uma resistência parcial ou total contra estes fagos.

Este plasmídeo, introduzido por conjugação na estirpe receptora, é portador de um ou mais genes que lhe conferem um carácter conjugativo. Ele é portanto susceptível de ser transferido por conjugação, mecanismo natural, para outras estirpes, por exemplo estirpes de interesse industrial.

Este plasmídeo é eventualmente portador de um ou mais genes que conferem à bactéria láctica que o contem a capacidade de metabolizar a lactose.

Este plasmídeo pode igualmente ser portador de um ou mais genes que conferem à bactéria láctica que o contem uma actividade bactericida (a que ela é imune). Esta característica é uma vantagem para uma cultura pura ou para uma cultura mista de bactérias que contenham todas este plasmídeo, pois evita a proliferação de bactérias contaminantes.

Um plasmídeo particularmente adequado é o que tem as características de um plasmídeo escolhido entre:

- o plasmídeo pPF66 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-945;

- o plasmídeo pPF72 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-946;

- o plasmídeo pPF107 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-947;

- o plasmídeo pPF118 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-944;

- o plasmídeo pPF144 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositado na CNCM em 12 de Abril de 1990 com o nº I-945;

ou cuja sequência apresenta um grau de homologia elevado com a de um dos plasmídeos abaixo.

Cada um dos 5 plasmídeos referidos abaixo, respectivamente de 66, 72, 107, 118 e 144 Kb, foi isolado por digestão enzimática do DNA genómico e análise deste último por electroforese por pulso de campo em gel de agarose, num clone de transconjugante obtido por crescimento de uma estirpe dadora escolhida entre as estirpes já citadas, depositadas no Instituto Pasteur respectivamente com os nº: I-943, I-941, I-942, I-939 e I-940 e a estirpe receptora Lactococcus lactis ssp lactis 845.

Estes plasmídeos em que uns são manifestamente produto de recombinação genética, por exemplo os cointegrados, plasmídeos da estirpe dadora, foram caracterizados pelo padrão de restrição e eventualmente pelo seu mapa de restrição. Cada um destes plasmídeos é portador de pelo menos um mecanismo de resistência aos fagos, conferindo à bactéria láctica que o transporta uma resistência parcial ou total a 30°C contra os fagos do grupo I de homologia e aos fagos do grupo III de homologia, esta resistência sendo em geral conservada a 40°C. Alguns destes plasmídeos possuem elementos genéticos que conferem às bactérias lácticas que os possuem a capacidade de metabolizar a lactose ou uma actividade bactericida.

Outros plasmídeos que será possível isolar noutros clones de transconjugantes obtidos a partir das mesmas estirpes dadoras terão uma sequência com um grau de homologia elevado com e/ou compreendendo uma parte importante da sequência dos 5 plasmídeos atrás referidos. Outros destes plasmídeos não terão nem homologia nem subsequência comum aos 5 plasmídeos atrás mas apresentarão igualmente um mecanismo de resistência aos fagos, codificado por outras sequências diferentes destas últimas.

O invento trata igualmente de uma bactéria láctica resistente aos fagos, de preferência pertencente à espécie Lactococcus lactis, que contem pelo menos uma molécula de DNA ou um plasmídeo como definido atrás. Esta molécula de DNA ou este plasmídeo podem ter sido introduzidos na bactéria láctica por conjugação, transformação, fusão de protoplastos ou por um outro método de transferência de genes.

Uma bactéria deste tipo particularmente adequada é a que é escolhida entre as estirpes de Lactococcus lactis ssp cremoris depositada na CNCM com os nº I-944, I-946, I-947 e I-948.

O invento diz respeito também à utilização de uma estirpe escolhida entre as 5 estirpes mencionadas no parágrafo anterior, as estirpes de Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM com os nº I-939 e I-943, a estirpe de Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940 e as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositada na CNCM com os nº I-941 e I-942 para transmitir por conjugação, transformação, transdução, fusão de protoplastos ou um outro método de transferir genes, um mecanismo de resistência aos fagos a uma estirpe de interesse industrial. Este mecanismo pode ser transportado por um plasmídeo ou por uma parte do genoma da bactéria. Logo que seja transportado por um plasmídeo é vantajoso transferi-lo por conjugação.

O invento diz igualmente respeito às estirpes de interesse industrial resistentes aos fagos assim obtidas.

O invento diz também respeito à utilização de uma estirpe escolhida entre as estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM com os nº I-939 e I-943, a estirpe

Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940 assim como estirpes de Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM com os nº I-941 e I-942, para se obter o plasmídeo definido atrás.

O invento será melhor entendido com a ajuda dos exemplos que se seguem.

Uma grande parte do conjunto de técnicas descritas nestas secções, bem conhecidas dos familiarizados com a matéria está exposta detalhadamente no manual de Sambrook Fritsch e Maniatis: "Molecular Cloning: a Laboratory manual" publicado em 1989 pelas edições Colda spring Harbor Press em Nova Iorque (2ª edição).

A descrição que se segue será melhor entendida com a ajuda das figuras 1 a 6.

As figuras 1 a 6 representam respectivamente os mapas de restrição dos plasmídeos pPF144, pPF107, pPF66, pPF72, pPF144.1 e pPF144.2, os números frente aos sítios de restrição simbolizam o número de Kb a partir de um sítio particular considerado arbitrariamente como origem. Nestas figuras estão representados na mesma direcção os sítios de restrição cuja sensibilidade do método de análise não permite distinguir. As Figuras 5 e 6 indicam de forma aproximada as regiões onde se encontra a origem de replicação de E. coli, designada *oris*, o gene de resistência à eritromicina, designado *Ery<sup>R</sup>*, assim como o ou os mecanismos de resistência aos fagos, designado *Rap*.

Exemplo 1:

Deteccção de estirpes de lactococcus muito resistentes a um largo espectro de bacteriófagos.

1) Constituição de uma colecção de bacteriófagos e caracterização parcial destes.

Constituiu-se uma colecção de bacteriófagos isolados a partir de lacto-soros de acidentes de fermentação, compreendendo os fagos seguintes:

- fago St11 descrito por PARADA J.L. et al. em Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 1352-1354;

- fago 01358 descrito por JARVIS A.W. et al., em Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 1031-1038;

- fago 0936 descrito por JARVIS A.W. et al., em Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 343-349;

- fago P008 descrito por ENGEL G. et al., em Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 1975, 27, 25-48;

- fagos 027, 029, 030, 031, 044, 049, 054, 055, 056, 057, 058, 059, 064, 065, 070 descritos por RELANO P. e no J. Gen. Microbiol., 1987, 133, 3053-3063;

- fagos derivados de colecções privadas designados aqui 053, 060 e 040.

Estes fagos foram objecto de uma caracterização a nível

molecular: espectro de hospedeiro, morfologia estudada no microscópio electrónico, composição proteica, perfis de restrição do DNA e hibridação DNA-DNA.

Estes fagos pertencentes aos três grandes grupos de homologia (I), (II) e (III), com base em estudos de hibridação de DNA/DNA (RELAND P. et al. (1987), J. Gen. Microbiol. 133, 3053-3063). Os grupos (I) e (III) compreendem unicamente fagos virulentos. O grupo (II) compreende fagos virulentos e fagos temperados. No interior de um mesmo grupo as homologias são fortes e de um grupo para outro as homologias são muito fracas. Os fagos do grupo (I) têm uma nucleocápside oblonga enquanto que os fagos do grupo (II) e (III) têm uma nucleocápside isométrica.

Esta colecção de 22 fagos é altamente representativa do conjunto de bacteriófagos que se pode encontrar em acidentes de fermentações na indústria de lacticínios.

2) Obtenção de um novo stock de fagos a partir de um stock de fagos mais antigo.

Cada um dos fagos da colecção foi multiplicado na estirpe indicadora (estirpe sensível ao fago considerado) da seguinte maneira:

1 ml do meio de cultura da bactéria indicadora de densidade óptica a 600 nm (daqui em diante  $DO_{600}$ ) com cerca de 0,6 (fase exponencial) foi removido e colocado em presença de 100  $\mu$ l de um stock de fagos e de cloreto de cálcio a 10 mM. A adsorção do fago à bactéria é efectuada durante 15 minutos a 30°C de acordo com a bactéria considerada. Depois a mistura é diluída quatro vezes com meio M17 (TERZAGHI et al. (1975), Appl. Environ

Microbiol. 29, 807-813) contendo cloreto de cálcio a 10 mM, de forma que a  $DO_{600}$  final não exceda 0,15. O conjunto foi colocado na estufa a 30°C até se obter lise bacteriana. Este novo stock de fagos foi em seguida centrifugado e o sobrenadante colocado a +4°C em presença de algumas gotas de clorofórmio com a finalidade de evitar o desenvolvimento de bactérias. Este método dá bons resultados: obtem-se em geral entre  $10^7$  e  $5 \times 10^{10}$  fagos/ml. Caso a lise não seja conseguida após 6 h de incubação, retiram-se 100 µl do sobrenadante e a manipulação é recomeçada a partir da adsorção do fago à bactéria.

### 3) Lisotipia.

#### - Estipes de lactococcus utilizadas:

21 estirpes de Lactococcus lactis ssp cremoris

14 estirpes de Lactococcus lactis ssp lactis

10 estirpes de Lactococcus lactis ssp lactis var.  
diacetylous

derivadas de colecções privadas.

#### - Protocolo de lisotipia:

Culturas crescidas durante a noite de lactococcus em meio M17 serviram para semear tubos de meio M17 de forma a haver uma fase exponencial de crescimento ( $DO_{600}=0,5$ ) 300 µl de cada uma das culturas foram misturados com 3 ml de agar mou M17 e cloreto de cálcio a 10 mM.

O conjunto foi espalhado sobre uma caixa de meio M17 gelosado contendo cloreto de cálcio a 10 mM. 5 µl de stock de fagos em meio de cultura foram depositados neste tapete. Estas caixas foram depositadas na estufa a 30°C durante uma noite.

Em todos os casos onde se observou uma lise, 5 µl de uma diluição de 1/100 foi igualmente testado. Quando não se observa lise nesta diluição fazem-se dois testes:

- 5 µl de stock de fagos são misturados directamente com 300 µl de cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento e cloreto de cálcio a 10 mM e espalhados numa caixa de meio gelosado contendo cloreto de cálcio. As caixas foram em seguida colocadas na estufa durante uma noite: observa-se o aparecimento eventual de placas de lise.

- o sobrenadante da cultura da bactéria tendo servido para fazer o stock de fagos é esterilizado por passagem através de um filtro de 0,45 µm. Em seguida testa-se num tapete de bactérias como um stock de fagos. O aparecimento ou não de um halo foi determinado em seguida.

- Resultados: no conjunto das 45 estirpes de lactococcus testadas, 12 estirpes são completamente resistentes a todos os fagos testados, (7 Lactis ssp cremoris, 2 L. lactis ssp lactis, 3 L. lactis ssp lactis var diacetylous), 9 estirpes são relativamente sensíveis aos fagos mas não permitem o desenvolvimento destes, (os 5 µl de stock de fagos inibem o desenvolvimento das bactérias quando estas são depositadas sob a forma de uma gota mas se são misturadas com o tapete bacteriano não se detecta qualquer placa de lise) (6 L. lactis ssp cremoris, 1 L. lactis ssp lactis, 2 L. lactis ssp lactis var. diacetylous) e 24 estirpes são sensíveis a pelo menos um fago.

Exemplo 2:

Transferência por conjugação de elementos genéticos implicados na resistência aos fagos - Obtenção de clones de 5 transconjugantes resistentes aos fagos.

A) Principais técnicas experimentais utilizadas:

1) conjugação (primeiro ciclo de conjugação):

- estirpe receptora: Lactococcus lactis ssp lactis S45, Lac<sup>-</sup>, Ery<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup> contendo 1) o plasmídeo pVA838 (MACRINA F.L. et al. (1982), Gène, 19, 345-353) que é portador da resistência à eritromicina Ery<sup>R</sup> e 2) uma marca cromossômica: a resistência à estreptomicina Str<sup>R</sup>.

A estirpe S45 foi obtida a partir da estirpe S124 (ela própria obtida a partir da estirpe L. lactis ssp lactis C2 como descrito no exemplo 3) como se segue.

A estirpe S124 foi tratada com ultravioletas de acordo com o protocolo descrito por L.L. Mc. KAY (1977) Journal of Bacteriology, 257-265). Espalhou-se em seguida a estirpe sobre as caixas de meio M17 (TERZAGHI B.E. et al., (1975) Appl. Env. Microbiol. 29, 807-813) gelosado contendo 500 µg/ml de estreptomicina e 0,5% de glucose. Um clone resistente à estreptomicina foi transformado pelo plasmídeo pVA 838 segundo uma técnica semelhante à descrita por POWELL I.B. et al. (POWELL I.B. et al. 1988 Appl. Environ. Microbiol., 54, 655). O protocolo detalhado utilizado está descrito a seguir. A estirpe obtida é a estirpe S45.

# Protocolo de transformação

10 ml de meio M17 a 20 mM de DL treonina foram semeados com 200 µl de uma cultura crescida durante a noite. A incubação foi realizada a 30°C até uma densidade óptica a 600 nm de um valor de 0,4. Depois esta cultura foi centrifugada. O sedimento foi ressuspensão em 10 ml de tampão SMP (sacarose 24 mM,  $MgCl_2$  1 mM, tampão de fosfatos 7 mM pH 6,5). O conjunto foi centrifugado. O sedimento foi ressuspensão em 900 µl de tampão SMP. 800 µl de células foram colhidas às quais se adicionou 5 µl de uma quantidade conhecida de DNA: o conjunto foi colocado numa cuvete de eléctrodo e deixado 2 min a +4°C. O choque eléctrico foi realizado com 25pF e 2,5 KV ("Gene pulser", Bio Rad). As células foram deixadas 10 minutos a +4°C, depois adicionou-se 0,8 ml de M17 x 2 contendo glucose a 0,4% e a mistura foi colocada num tubo Eppendorf. A incubação foi efectuada durante 1 hora a +30°C depois as células foram centrifugadas. O sedimento foi ressuspensão no líquido residual, misturado com meio gelosado, glucose a 0,4% e antibiótico adequado misturado foi espalhado numa caixa de meio gelosado contendo igualmente glucose e antibiótico. A incubação foi efectuada durante 24 h a 30°C.

- estirpes dadoras: - as 12 estirpes dadoras do exemplo 1 completamente resistentes a todos os fagos testados
- 8 das 12 estirpes do exemplo 1 sensíveis aos fagos mas não permitem o desenvolvimento destes (uma estirpe deste tipo foi eliminada pois não tinha crescimento suficiente).

As 20 estirpes são portadoras do carácter de resistência aos fagos Rap e da capacidade de fermentar a lactose lac. Elas são Rap<sup>+</sup>, Lac<sup>+</sup>, Ery<sup>S</sup> e Str<sup>S</sup>.

5 de entre estas 20 estirpes, as estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris S77 e S114, a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis S91 assim como as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var diacetylous S94 e S96 foram mantidas (v. B) a seguir pela sua capacidade para dar transconjungantes portadores das características Rap e Lac. Elas foram depositadas na CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes de l'Institut Pasteur) respectivamente com os números I-939, I-943, I-940, I-941 e I-942. Certas características destas estirpes estão expostas a seguir na tabela I a seguir.

TABELA 1

Características bioquímicas das estirpes S77, S91, S94, S96 e S114 testadas com o painel API\* 50 CH (API S.A.) e o meio API 50 CHL (API S.A.)

| Estirpes \ Açúcar |     |     |   |    |    |    |    |     |    |     |    |     |    |     |    |    |     |    |
|-------------------|-----|-----|---|----|----|----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|----|-----|----|
|                   | 4   | 5   | 6 | 10 | 11 | 12 | 13 | 18  | 22 | 24  | 25 | 26  | 27 | 28  | 29 | 32 | 36  | 39 |
| S77               |     | [+] |   | +  | +  | +  | +  | [+] | +  |     |    |     | +  | [+] | +  | +  |     |    |
| S91               | [+] | +   | + | +  | +  | +  | +  | +   | +  |     | +  | [+] | +  | +   | +  | +  | [+] |    |
| S94               |     | +   |   | +  | +  | +  | +  |     | +  | [+] | +  | +   | +  | +   | +  | +  | [+] |    |
| S96               |     | +   |   | +  | +  | +  | +  |     | +  | [+] | +  | +   | +  | +   | +  | +  | +   | +  |
| S114              |     |     |   |    | +  | +  | +  |     | +  |     |    |     |    |     | +  |    |     |    |

4: L Arabinose 5: Ribose 6: Sxilose 10: Galactose 12: Frutose 13: Manose

18: Manitol 22: N acetilglucosamina 24: Arbutina 25: Esculina 26: Salicina 27: Celobiose

28: Maltose 29: Lactose 32: Tre-balose 36: Amidon 39: Gentibiose

+: Utilização do açúcar pelo microorganismo após 24 horas de incubação em anaerobiose

(+): Utilização parcial do açúcar pelo microorganismo após 24 horas de incubação em aerobiose

Os açúcares do painel API 50 CH não correspondendo aos números referidos atrás não são metabolizados

\* meio conhecido para caracterização das estirpes pelas suas propriedades bioquímicas:

16

A estirpe S91 possui uma boa cinética de crescimento a 30°C e a 40°C em meio M17, mas uma ligeira inibição do crescimento em presença de 4% de NaCl a 30°C em meio M17.

\*As estirpes S94 e S96 possuem uma boa cinética de crescimento a 30°C em meio M17. A 40°C, este crescimento é muito fraco, o mesmo que em presença de 4% de NaCl a 30°C em meio M17.

\* As estirpes S77 e S114 têm uma cinética fraca de crescimento a 30°C em meio M17. Não se observa crescimento a 40°C, nem mesmo na presença de 4% de NaCl a 30°C em meio M17.

A selecção dos transconjugantes faz-se pela capacidade de fermentar a lactose e pela resistência à eritromicina, a resistência à estreptomicina servindo para diferenciar os dadores dos receptores.

#### Protocolo de conjugação:

A partir da cultura crescida durante a noite em meio M17, com uma quantidade de glucose variando de acordo com a estirpe considerada, misturaram-se estirpes receptora e dadora, 66 µl da estirpe receptora e 133 µl da estirpe dadora. Estas bactérias foram em seguida espalhadas sobre caixas de Pétri contendo leite desnatado a 11%, glucose a 0,4% e agar. A incubação realizou-se durante 16 horas a 30°C, para a conjugação se efectuar. 1 ml de leite desnatado reconstituído a 11% contendo 4% de lactose foi espalhado e depois colhido o leite contendo as bactérias. Finalmente fracções de 200 µl ou diluições foram espalhadas em caixas de Pétri com meio Elli 1, meio Elliker modificado (de composição e preparação: bactotripton 20 g, extracto de levedura 5 g, peptona 2,5 g, D[+] lactose 10g, NaCl 4g, acetato Na 1,5 g, ácido ascórbico 0,5 g, agar 15g, H<sub>2</sub>O q.s.p.

1 l, pH 6,8, esterilização 15 min. a +120°C - cf. ELLIKER P.R. et al., (1956), J. Dairy Sci., 39, 1611-1612), adicionada estreptomomicina a 5µg/ml com a finalidade de seleccionar as estirpes receptoras e tintura de bromocresol (KAY Mc. et al., (1972) Appl. Microbiol. 23, 1090-1096) com a finalidade de recuperar entre as receptoras os transconjugantes Lac<sup>+</sup> de cor amarela. Estas experiências permitem principalmente determinar a eficácia teórica da conjugação definida como a razão entre o número de transconjugantes obtidos e o número de células receptoras adicionadas no início da experiência de conjugação assim como calcular a eficácia real da conjugação multiplicada pelo inverso do factor de multiplicação das receptoras durante a conjugação.

## 2) Detecção de transconjugantes resistentes aos fagos.

Cada um dos conjugantes derivados do crescimento por conjugação entre uma estirpe dadora e uma estirpe receptora foi isolado numa caixa com meio Elli-1 a que se adicionou 5 µg/ml de Eritromicina e a tintura de bromocresol com a finalidade de se obter uma cultura pura. Depois 300 µl desta última em fase exponencial de crescimento ( $DO_{600}=0,5$ ) foram espalhados, em presença de 3 ml de meio M17 gelosado contendo cloreto de cálcio 10 mM, sobre uma caixa de Pétri de meio M17 contendo cloreto de cálcio 10 mM. 5 µl de stock de fagos ou 5 µl de diferentes diluições deste stock de fagos foram depositados sobre este tapete de células. A mesma experiência foi realizada com a estirpe receptora testemunha S45, a única diferença sendo o facto de se adicionar glucose a 0,4% ao meio de cultura. As caixas foram colocadas na estufa a 30°C durante uma noite. Um mecanismo de resistência a um fago particular no transconjugante foi visualizado pela diferença do título de fagos entre o transconjugante e a estirpe S45 para este fago e igualmente pela diferença

das placas de lise para este fago. O título de fagos T, igualmente designado título fágico, que representa o número de fagos activos na estirpe testada por ml de stock de fagos depositados no tapete de células, expresso em PFU/ml (PFU = Plaque Forming Unit) foi calculado com a ajuda da fórmula

$T = N \times 2 \times 10^{x+2}$  na qual N representa o número de placas de lise obtidas na diluição  $10^{-x}$ , x sendo o parâmetro de diluição. O diâmetro das placas de lise foi assim medido. Este parâmetro dá indicações quantitativas sobre o rendimento unitário, número de fagos obtidos após um ciclo de multiplicação fágica para um fago que infecta uma bactéria. Quanto maior a placa de lise maior o rendimento unitário. Os fagos utilizados para pôr em evidência os mecanismos de resistência aos fagos são os fagos 053 e 024 (grupo I de homologia assim como o fago 059 (grupo III de homologia).

#### B) Resultados.

1) Transferência por conjugação da capacidade de fermentar a lactose.

Observámos tal como Mc Kay et al (Mc KAY et al., (1980) Appl. Env. Microbiol. 40, 84-91) que todas as estirpes não são capazes de transferir a capacidade de fermentar a lactose. Nos 20 cruzamentos efectuados no primeiro ciclo de conjugação, só 6 cruzamentos deram transconjugantes, 2 com as estirpes L. lactis ssp lactis S88 e S91), 2 com as estirpes L. lactis ssp cremoris S77 e S114, assim como as 2 estirpes L. lactis ssp lactis var. diacetylous S94 e S96. O quadro 2 que se segue descreve a eficácia teórica Et de transferência da capacidade de fermentar a lactose, definido como a razão entre o número de transconjugantes obtidos e o número inicial de receptores, para as 6 estirpes abaixo. A testemunha era constituída pela estirpe S45 apenas.

Tabela 2

Eficácia teórica da transferência por conjugação da capacidade de fermentar a lactose.

| Estirpe dadora | Et                   |
|----------------|----------------------|
| S77            | $5,5 \times 10^{-7}$ |
| S91            | $4 \times 10^{-8}$   |
| S96            | $1,5 \times 10^{-5}$ |
| S88            | $4 \times 10^{-8}$   |
| S94            | $1,2 \times 10^{-7}$ |
| S114           | $4 \times 10^{-8}$   |
| S45            | $< 8 \times 10^{-9}$ |

A estirpe dadora mais eficaz para a transferência por conjugação da capacidade de fermentar a lactose é a estirpe S96.

Por outro lado, verificou-se por extracção do conteúdo plasmídico dos transconjugantes e análise por electroforese em campo contínuo (cf. exemplo 3) a presença em cada um deles do plasmídeo pVA838.

Um só dos 6 transconjugantes, o derivado do cruzamento de S88 x S45, se revelou sensível à acção da estreptomicina: parece que houve transferência do plasmídeo pVA838, em princípio não conjugativo, da estirpe S45 para a estirpe S888. Este transconjugante foi eliminado.

Guardou-se para análise posterior os 5 transconjugantes derivados dos cruzamentos S77 x S45, S91 x S45, S96 x S45, S94 x S45 e S114 x S45, designados S45-77, S45-91, S45-96, S45-94 e S45-114.

## 2) Pesquisa de transconjugantes resistentes aos fagos:

Os principais resultados obtidos com os transconjugantes guardados, usando a técnica descrita em A)2), estão apresentados no quadro 3 a seguir, o qual descreve para estas últimas e para a estirpe S45 (testemunha) o título fágico e o diâmetro da placa de lise.

Tabela 3

Resistência aos fagos dos transconjugantes Lac<sup>+</sup> a uma temperatura de 30°C.

| Estirpe          | Fago                                                                 |                             |                     |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
|                  | título fágico (número de agos/ml)/<br>diâmetro da placa de lise (mm) |                             |                     |
|                  | 024<br>(grupo I)                                                     | 053<br>(grupo I)            | 059<br>(grupo III)  |
| S45-91 clone 1   | 0/0                                                                  | $4 \times 10^7 / < 0,25$    | 0/0                 |
| S45-96 clone 1   | 0/0                                                                  | 0/0                         | 0/0                 |
| S45-77 clone 6   | $8 \times 10^7 / < 0,25$                                             | $2 \times 10^{10} / < 0,25$ | 0/0                 |
| S45-114 clone 1  | $8 \times 10^6 / < 0,25$                                             | $2 \times 10^9 / < 0,25$    | 0/0                 |
| S45-94 clone 1   | 0/0                                                                  | $10^{10} / < 0,25$          | 0/0                 |
| S45 (testemunha) | $2 \times 10^9 / 2$                                                  | $2 \times 10^{10} / 3$      | $3 \times 10^9 / 2$ |

Observa-se pela leitura do quadro acima que:

- o transconjugante S45-96 clone 1 resiste aos 3 fagos testados;

- os transconjugantes S45-91 clone 1 e S45-94 clone 1 são resistentes aos fagos Ø24 e Ø57 e parcialmente resistentes ao fago Ø53 (título fágico inferior ao da estirpe testemunha e placas de lise de diâmetro inferior a este);

- os transconjugantes S45-77 clone 6 e S45-114 clone 1 são resistentes aos fagos Ø24 e Ø53.

Deve-se notar que para o transconjugante S45-77, foram testados 13 clones entre os quais apenas 2 (portanto o clone 6) apresentam um mecanismo de resistência aos fagos. Este último não é pois forçosamente transferido simultaneamente com a capacidade de fermentar a lactose. Este provavelmente presente um plasmídeo, não está necessariamente presente no mesmo plasmídeo do mecanismo de resistência aos fagos, o qual sendo conjugativo mobiliza quando da conjugação o plasmídeo portador da capacidade de fermentar a lactose pela formação de um cointegrado.

Os transconjugantes S45-91 clone 1, S45-96 clone 1, S45-77 clone 6, S45-114 clone 1 e S45-94 clone 1 foram depositados na CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes de l'Institut Pasteur) respectivamente com os nº I-945, I-947, I-944, I-948 e I-946.

### Exemplo 3:

#### Deteccção dos plasmídeos portadores de mecanismos de resistência a fagos.

##### A) Principais técnicas experimentais utilizadas.

- 1) Limpeza das estirpes dos respectivos plasmídeos.

Constituiu-se uma gama de concentrações em novobiocina no meio M17 contendo glucose a 0,4%. Cada um destes tubos foi semeado de forma a ter  $10^5$  células/ml. A incubação foi efectuada durante 18 horas a +30°C. Depois o conteúdo dos dois tubos cuja concentração é a mais próxima da concentração mínima inibidora (CMI) foi espalhado com ansa de platina sobre meio M17 contendo glucose a 0,4%. Após incubação, os clones foram testados para diferentes características como se segue:

2) Teste das características após tratamento com novobiocina na placa de microtitulação.

Nas placas de microtitulação (96 cavidades de 500 µl, COSTAR) 100 µl de meio M17 contendo glucose e um clone semeado com a ansa de platina foram colocadas em cada cavidade. A incubação foi realizada de forma a ter-se uma fase exponencial de crescimento.

Depois 2 a 3 µl de cada cultura foram depositados em caixas de Pétri contendo diferentes meios para testar:

- meio Elli-1 + pó de bromocresol (0,004%): testar a capacidade de fermentar a lactose;

- meio M17 + 5 µg/ml de eritromicina + glucose (0,4%) : teste de resistência à eritromicina;

- meio M17 + 500 µg/ml de estreptomicina + glucose (0,4%) : teste de resistência à estreptomicina;

- meio M17 +  $\text{CaCl}_2$  +  $10^7$  fagos 059 (grupo III) espalhados com ansa de platina + glucose (0,4%) : teste de resistência aos fagos.

Este fago foi escolhido por todos os mecanismos de resistência aos fagos serem totalmente activos face a este fago (c.f. exemplo 2).

### 3) Extracção dos plasmídeos das estirpes.

Os plasmídeos foram extraídos por uma técnica de lise alcalina. Uma cultura crescida durante a noite de estirpes foi realizada em 5 ml de meio de cultura M17 na presença ou não de antibióticos e/ou de glucose a 0,4% (peso/volume). O mesmo volume de meio M17 x 2 foi adicionado e as culturas foram deixadas na estufa durante 1 hora. Elas foram em seguida centrifugadas. O sedimento foi ressuspensão no meio líquido residual. O conjunto foi centrifugado numa centrifuga para tubos Eppendorf. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensão na ponta de uma pipeta com 900  $\mu\text{l}$  de TES (Tris 100 mM, EDTA 20 mM, sacarose 20%) contendo lisozima a 4 mg/ml; uma incubação foi efectuada 30 min a 37°C depois as células foram centrifugadas durante 1 min. O sedimento foi ressuspensão em 300  $\mu\text{l}$  de SDS 1%; Misturou-se NaOH 0,15 N na ponta de uma pipeta e deixou-se 10 minutos a +25°C. Em seguida adicionou-se 225  $\mu\text{l}$  de acetato de sódio 3M, pH 4,8: 10 min. a 4°C. O conjunto foi centrifugado a 10 000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi tratado com igual volume de uma mistura de fenol/ $\text{CHCl}_3$ /álcool isoamílico (24:23:1) depois centrifugado a 10 000g, 1 min a +25°C. A fase aquosa foi precipitada com 2,5 volumes de etanol durante 30 min. a -70°C. A mistura foi centrifugada 10 min. a 4°C, o sedimento lavado com etanol a 70% e depois liofilizado e ressuspensão em 50  $\mu\text{l}$  de água. 5  $\mu\text{l}$  do plas-

mídeo foram aplicados num gel de agarose. Este DNA está suficientemente puro para ser tratado por enzimas de restrição.

#### 4) Segundo ciclo de conjugação:

- estirpe receptora: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* S124,  $\text{Lav}^-$ ,  $\text{Ery}^R$ ,  $\text{Str}^S$  contendo o plasmídeo pVA838.

A estirpe S 124 foi obtida a partir da estirpe de *Lactococcus* ssp *lactis* C2 (LL. Mc. KAY et al (1977) J. Bacteriol. 257-265) como se segue.

A estirpe de *L. lactis* ssp *lactis* C2 foi tratada com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, como descrito por Mc. Kay e seus colaboradores (1970). (LL. Mc. KAY et al., J. Bacteriol. 102, 804-809). As células tratadas foram espalhadas sobre o meio Elli-1 + pó de bromocresol + 0,5% de lactose para seleccionar as  $\text{Lac}^-$ . Uma estirpe  $\text{Lac}^-$ , tendo perdido os 5 plasmídeos que possuía a estirpe C2, foi transformada com o plasmídeo pVA838 de acordo com o protocolo de transformação exposto no Exemplo 2. A nova estirpe obtida foi designada S124.

- Estirpes dadoras: - certas estirpes transconjugantes do primeiro ciclo de conjugação portadoras de um mecanismo de resistência aos fagos, sem plasmídeo pVA838.

A selecção dos transconjugantes fez-se pela capacidade de fermentar a lactose e pela resistência à eritromicina, a resistência à eritromicina servindo para diferenciar as dadoras das receptoras.

O protocolo de conjugação é o utilizado no exemplo 1.

## B) Resultados.

### 1) Limpeza de plasmídeos dos transconjugantes:

A eliminação dos plasmídeos pela novobiocina deve dar pelo menos duas informações importantes:

- se uma característica desaparece após limpeza, um gene ou vários genes responsáveis por esta característica são provavelmente transportados por um ou mais plasmídeos;

- a segregação da capacidade de fermentar a lactose relativamente à resistência aos fagos, independente ou dependente, pode indicar-nos que ou os genes responsáveis por estes fenótipos não são ou são, respectivamente transportados pelo mesmo plasmídeo.

Após tratamento com novobiocina para cada estirpe testada, examinou-se, pelo menos 100 clones de cada um dos transconjugantes guardados anteriormente, três características:

\* capacidade para fermentar a lactose,

\* resistência à eritromicina transportada pelo plasmídeo pVAB38,

\* resistência ao fago Ø59 (grupo III de homologia).

A resistência à eritromicina serve de testemunha interna de limpeza.

Os resultados obtidos para os transconjugantes guardados, a estirpe S45 (testemunha) e as estirpes dadoras, tratadas com novobiocina (cf. b) estão descritas na tabela 4 que se segue:

Tabela 4

Percentagem do número de clones possuindo após tratamento com novobiocina um fenótipo particular relativamente ao número total de clones testados.

| Estirpe            | Fenótipo                          |                                   |                                   |                                   |                  |                  |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
|                    | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup> | Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup> | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup> | Rap <sup>-</sup> Lac <sup>+</sup> | Ery <sup>R</sup> | Ery <sup>S</sup> |
| S45-91<br>clone 1  | 48                                | 52                                | 0                                 | 0                                 | 72               | 28               |
| S45-96<br>clone 1  | 100                               | 0                                 | 0                                 | 0                                 | 43               | 57               |
| S45-77<br>clone 6  | 96                                | 4                                 | 0                                 | 0                                 | 78               | 22               |
| S45-114<br>clone 1 | 0                                 | 44                                | 12                                | 44                                | 74               | 26               |
| S45-94<br>clone 1  | 11                                | 2                                 | 87                                | 0                                 | 37               | 63               |
| S45                | 0                                 | 100                               | 0                                 | 0                                 | 39               | 61               |
| S91                | 38                                | 0                                 | 62                                | 0                                 | /                | /                |
| S96                | 46                                | 0                                 | 54                                | 0                                 | /                | /                |
| S77                | 100                               | 0                                 | 0                                 | 0                                 | /                | /                |
| S114               | 100                               | 0                                 | 0                                 | 0                                 | /                | /                |
| S94                | 42                                | 0                                 | 58                                | 0                                 | /                | /                |

Rap: resistência aos fagos; Lac: capacidade de fermentar a lactose;

Ery<sup>R</sup>: resistência à eritromicina;

Ery<sup>S</sup>: sensibilidade à eritromicina.

Pela leitura da tabela 4 constata-se que:

- As características Rap e Lac estão presentes em todos os clones do transconjugante S45-96 clone 1. De qualquer forma não se pode deduzir que os genes responsáveis por estes dois fenótipos não sejam transportados pelos plasmídeos: com efeito acontece que certos plasmídeos são resistentes ao tratamento com novobiocina. A eficácia da novobiocina não pode ser posta em causa pela limpeza do plasmídeo pVA838 se ter efectuado nas boas proporções (57%).

- Os transconjugantes S45-91 clone 1, S45-77 clone 6, S45-114 clone 1 e S45-94 clone perderam efectivamente após limpeza, numa certa proporção, as duas características. Estes resultados indicam a origem plasmídica provável para as características Lac e Rap nestes 4 transconjugantes.

- Os transconjugantes S45-94 e S45-114 dão após limpeza estirpes  $Rap^+ Lac^-$  e/ou  $Rap^- Lac^+$ . Esta segregação indica que os genes responsáveis pelas características Lac e Rap não são transportados pelo mesmo plasmídeo.

## 2) Limpeza plasmídica das estirpes dadoras.

As estirpes S77 e S114 (as duas L. lactis ssp cremoris) são insensíveis à limpeza pela novobiocina.

As estirpes S91, S96 e S94 podem perder por limpeza - parecendo de forma parcial- a capacidade de fermentar a lactose (esta característica não é completamente perdida pois após 24 horas de incubação a 30°C os clones  $Lac^-$  desenvolvem uma cor amarelo pálido no meio Elli-1: subsiste pois uma actividade  $Lac^+$

residual nestas estirpes) mas elas conservam a sua resistência aos fagos.

3) Extração plasmídica das estirpes dadoras e dos transconjugantes e análise por electroforese.

As extracções dos plasmídeos e análise em gel de electroforese efectuadas de acordo com a técnica descrita em A)5) não permitiram visualizar os plasmídeos responsáveis pelas características Lac e Rap (estes resultados explicam-se pelo grande tamanho dos plasmídeos, os quais não podem ser analisados senão pela técnica de pulso de campo exposta no Exemplo 4).

4) Transferência por conjugação da capacidade de fermentar a lactose no segundo ciclo de conjugação.

O quadro 5 a seguir descreve a eficácia teórica  $E_t$  de transferência da capacidade de fermentar a lactose, definido como a razão entre o número de transconjugantes obtidos e o número inicial de receptores, assim como a eficácia de fermentar a lactose, igual à eficácia teórica multiplicada pelo inverso do factor de multiplicação dos receptores durante a conjugação, para 5 clones de transconjugantes  $Lac^+$  e  $Rap^+$ . A testemunha é constituída apenas pela estirpe S124.

Tabela 5

Eficácias teóricas e reais da transferência por conjugação da capacidade de fermentar a lactose.

| Estirpe dadora  | Et                   | Er                   |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| S45-77 clone 6  | 1                    | $2 \times 10^{-1}$   |
| S45-91 clone 1  | $2,4 \times 10^{-1}$ | $2,3 \times 10^{-2}$ |
| S45-96 clone 1  | $7,3 \times 10^{-1}$ | $7 \times 10^{-2}$   |
| S45-94 clone 1  | $6,1 \times 10^{-7}$ | $5,7 \times 10^{-8}$ |
| S45-114 clone 1 | $3,8 \times 10^{-7}$ | $4 \times 10^{-8}$   |
| S 124           | $< 8 \times 10^{-9}$ |                      |

Constata-se:

- A frequência da transferência da capacidade de fermentar a lactose é consideravelmente mais importante com estes transconjugantes do que com as estirpes dadoras do primeiro ciclo de conjugação, resultado particularmente claro com os transconjugantes S45-77 clone 6, S45-91 clone 1 e S45-96 clone 1. Verificou-se que nos 20 clones destes transconjugantes a resistência aos fagos 059 (assim como a sensibilidade à estreptomicina característica transportada pela estirpe receptora S124). As características Rap e Lac são portanto transferidas simultaneamente. Estes resultados confirmam a hipótese (cf. principalmente o exemplo 2 atrás) segundo a qual o primeiro ciclo de conjugação seleccionou um caso relativamente raro: a formação de um cointegrado entre dois plasmídeos, um portador da capacidade de fermentar a lactose e o outro de um mecanismo de resistência aos fagos. O cointegrado sendo formado, a sua transferência por conjugação é

mais frequente e daí uma maior eficácia de transferência no segundo ciclo de conjugação.

- A eficácia real da transferência destas características está entre 2 e 20% para os transconjugantes S45-77 clone 6, S45-91 clone 1 e S45-96 clone 1.

#### Exemplo 4:

Isolamento e caracterização dos plasmídeos portadores dos mecanismos de resistência aos fagos.

##### A) Principais técnicas experimentais utilizadas.

###### 1) Electroforeses em pulso de campo.

Elas foram realizadas graças ao sistema "Pulsaphor Plus" (LKB-Pharmacia). Os géis foram feitos com agarose a 1%, 110 ou 130 ml de acordo com os casos. O tanque contém 2,6 l de tampão TBE (composição: Tris HCl 30 mM pH 8,5, ácido bórico 50 mM, EDTA 1 mM). A migração foi realizada a 300 V contantes, com um tempo de pulsação e uma duração de migração determinadas previamente de acordo com a separação pretendida dos fragmentos de DNA.

###### 2) Preparação de marcadores de tamanho.

Os oligómeros de DNA do fago lambda foram preparados como descrito por Waterbury e Lane (WATERBURY P.G. e LANE M.G. (1987) Nucleic Acids Res., 15, 3930).

Um stock de fagos lambda purificados em cloreto de cézio foi doseado a 260 nm. Considerando que uma  $DO_{260}$  de valor 1 corresponde a 50 µg/ml de DNA, 75 µg de DNA ressuspensos em 500 µl de tampão TMN (Tris-HCl 50 mM pH 8,  $MgCl_2$  10 mM, NaCl 10 mM) pré-aquecido a 37°C, foram misturados com 500 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 1,5% num tampão TMN mantido a 45°C; a mistura foi imediatamente repartida por matrizes de plástico de 125 µl destinadas para este efeito, e arrefecida a +4°C durante 15 minutos. As "inserções" assim constituídas foram ressuspensas numa solução composta por: EDTA 0,5M, SDS 1%, proteinase K 1 mg/ml, Tris-HCl 10 mM pH 9, durante 4 horas a 55°C com uma agitação fraca, as "inserções" foram em seguida dialisadas contra 50 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, 2 x 1 h a +25°C.

### 3) Preparação dos DNAs genómicos.

Eles foram preparados não pelo método clássico de Mc Clelland et al (Mc CLELLAND et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15, 5985-6005) mas por uma técnica derivada desta última exposta a seguir, permitindo incluir 10 vezes mais DNA genómico num determinado volume de agarose de baixo ponto de fusão do que este método:

Realizou-se uma cultura crescida durante a noite das estirpes na presença ou não de antibióticos e/ou de glucose a 0,4%. Esta cultura serviu para semear 15 ml de meio de cultura M17 numa proporção de 2% (volume/volume). A incubação foi realizada em estufa até ter uma densidade óptica de 0,5 a 0,8 a 600 nm. Em seguida a cultura foi centrifugada. O sedimento foi lavado 1 vez com 5 ml de tampão SMC (sacarose 0,5M ; maleato 0,02 M; cloreto de cálcio 0,05M; pH 6,5). As células foram centrifugadas e o sedimento foi ressuspensos em 15 ml de tampão SMC contendo

lisozima a 4 mg/ml durante 2 h a 37°C. As células foram centrifugadas e o sedimento foi ressuspenso em 450 µl de tampão SMC. As células foram incubadas durante 10 min a 37°C depois retirou-se 500 µl e misturou-se com 500 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% em tampão SMC, mantido fundido a 50°C. Imediatamente, esta solução foi repartida pelas matrizes de plástico para este efeito, em quantidades de 125 µl. A agarose solidifica durante 15 min a 4°C. As "inserções" assim obtidas foram colocadas em 2,5 ml de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 9, EDTA 100 mM, EGTA 10 mM, 1% SDS, proteinase K 1 mg/ml) durante 24 horas a 55°C com uma agitação fraca. As "inserções" foram em seguida dialisadas em 50 ml de tampão (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 10 mM) com 250 µl de PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoreto) a 20 mM durante 1 h a +25°C. Fizeram-se em seguida mais duas diálises nas mesmas condições, mas sem PMSF. As "inserções" podem também ser assim conservadas pelo menos 6 meses a 4°C em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 10 mM).

O método de Mc Clelland et al. (1987) consiste, por seu lado, na inclusão das células na fase exponencial de crescimento na agarose de baixo ponto de fusão e em seguida fazer o tratamento com lisozima mais proteinase K e SDS. O tratamento das células com lisozima antes da sua inclusão no agar permite aumentar a concentração de DNA na agarose.

#### 4) Hidrólise do DNA por uma enzima de restrição.

Um terço ou um quarto de uma inserção foi colocado num tubo Eppendorf na presença de 1 ml de tampão de hidrólise indicado pelo fabricante. As "inserções" foram incubadas 15 min a 37°C em banho-maria. Em seguida 800 a 850 µl de tampão foram retirados de acordo com o tamanho da "inserção" e adicionadas 25 unidades

de enzima de restrição ao restante tampão. As "inserções" foram incubadas 24 horas à temperatura de actividade normal da enzima.

5) Perfis de restrição do plasmídeo em pulso de campo.

É necessário utilizar "inserções" preparadas de acordo com a técnica que permite ter 10 vezes mais DNA (ver 3) atrás). Após hidrólise do DNA e migração em pulso de campo, os fragmentos de DNA foram retirados do gel de agarose. Estes pedaços de agarose foram em seguida tratados com enzimas de restrição como uma "inserção" clássica.

6) Resolução dos plasmídeos de forma circular em pulso de campo.

O DNA hidrolizado pela enzima de restrição ApaI de uma estirpe bacteriana migra em pulso de campo. O gel foi descolado e o DNA sofreu uma segunda migração em campo contínuo a 90° da direcção inicial após irradiação com ultravioletas durante 5 minutos. Esta técnica, derivada de um método clássico (Hintermann et al., (1981) Plasmid 5, 371-373) permite por um lado reparar o DNA na forma super-enrolada que migra de forma diferente do DNA linear, e por outro lado libertar do plasmídeo na forma circular relachada.

## B) Resultados.

### 1) Análise dos DNAs genómicos dos transconjugantes limpos e não limpos:

O interesse principal da técnica de electroforese em gel de agarose em pulso de campo é de permitir a separação de fragmentos de DNA de grande tamanho, em particular de um tamanho superior a 20 Kb.

Os DNAs totais dos transconjugantes S45-91 clone 1, S45-96 clone 1, S45-77 clone 6, S45-114 clone 1 e S45-94 clone 1 assim como da estirpe receptora (testemunha), limpos e não limpos foram hidrolizados com a ajuda da enzima de restrição ApaI e os fragmentos de grande tamanho obtidos foram analisados por electroforese em pulso de campo num gel de agarose. Conseguiu-se assim evidenciar fragmentos supranumerários, presentes nos transconjugantes e não na estirpe receptora.

A tabela 6 a seguir descreve para os transconjugantes o tamanho aproximado (em Kb) destes fragmentos supranumerários:

Tabela 6

Correlação entre os fenótipos obtidos antes e após limpeza com novobiocina e os fragmentos supranumerários visíveis após migração em pulso de campo.

| Transconjugante                                         | Fenótipo                                                                                                                                         | Fragmento supranumerário (Kb) |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| S45-91 clone 1 não limpo<br>limpo                       | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup><br>Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup>                                                                           | 144<br>0                      |
| S45-96 clone 1 não limpo                                | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup>                                                                                                                | 107                           |
| S45-77 clone 1 não limpo<br>limpo                       | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup><br>Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup>                                                                           | 118<br>0                      |
| S45-114 clone 1<br>não limpo<br>limpo<br>limpo<br>limpo | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup><br>Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup><br>Rap <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup><br>Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup> | 66<br>0<br>66<br>0            |
| S45-94 clone 1 não limpo<br>limpo<br>limpo              | Rap <sup>+</sup> Lac <sup>+</sup><br>Rap <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup><br>Rap <sup>+</sup> Lac <sup>-</sup>                                      | 57 + 72<br>0<br>72            |

Constata-se que:

- Os transconjugantes S45-91 clone 1 e S45-77 clone 6 apresentam o fenótipo Rap<sup>+</sup> Lac<sup>+</sup> na presença de um fragmento supranumerário de 144 Kb e (respectivamente) de um fragmento supranumerário de 118 Kb. Após limpeza eles apresentam o fenótipo Rap<sup>-</sup> Lac<sup>-</sup> na ausência do fragmento supranumerário. As características Lac e Rap são portanto transportadas por cada um dos dois fragmentos supranumerários atrás.

- O transconjugante S45-96 clone 1 apresenta o fenótipo  $Rap^+ Lac^+$  ligado à presença de um fragmento supranumerário de 107Kb o qual não se pode limpar com novobiocina. Este é portanto portador das características  $Rap$  e  $Lac$ .

- O transconjugante S45-114 clone 1  $Rap^+ Lac^+$  apresenta um fragmento supranumerário de 66 Kb. Pode-se correlacionar o desaparecimento do fenótipo  $Rap^+$  após limpeza com a deste fragmento supranumerário. Este é portanto portador de um mecanismo de resistência aos fagos (a característica  $Lac$  é provavelmente transportada por um outro fragmento supranumerário não detectado).

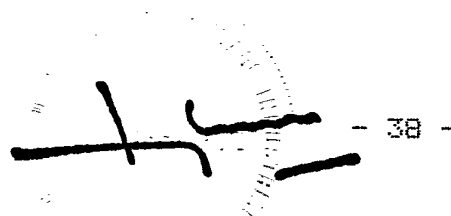
- O transconjugante S45-94 clone  $Rap^+ Lac^+$  apresenta dois fragmentos supranumerários de 57 e 72 Kb. Pode-se correlacionar o desaparecimento do fenótipo  $Rap^+$  após limpeza com a do fragmento supranumerário de 57 Kb).

O fragmento supranumerário de 72 Kb é portador de um mecanismo de resistência aos fagos (e o fragmento supranumerário de 57 Kb a característica  $Lac$ ).

Os fragmentos supranumerários de 144 Kb, 107Kb, 118 Kb, 66 Kb e 72 Kb são portanto portadores de um mecanismo de resistência aos fagos. Em seguida serão designados respectivamente pPF144, pPF107, pPF118, pPF66 e pPF72.

## 2) Caracterização dos fragmentos de DNA supranumerários:

Os fragmentos supranumerários pPF144, pPF107, pPF118, pPF66 e pPF72 foram hidrolisadas pela enzima de restrição  $ApaI$  e



submetidos ao tratamento descrito em A) 6). Esta experiência permitiu mostrar que estão recuperados todos lineares nos pedaços de gel de agarose.

a) Mapas de restrição dos fragmentos supranumerários pPF144, pPF107, pPF66 e pPF72:

Com o fim de estabelecer mapas de restrição, os fragmentos supranumerários pPF144, pPF107, pPF66 e pPF72 foram submetidos a digestões simples, duplas ou triplas com a ajuda de diferentes enzimas de restrição, principalmente as enzimas ApaI, BamHI, BglII, SacI, SacII e Sall e os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose com pulso de campo. Quando isto foi possível, o DNA genómico dos transconjugantes foi por outro lado digerido com a ajuda de outras enzimas diferentes de ApaI para linearizar os fragmentos supranumerários numa outra direcção e analisado por electroforese em campo de pulso. Isto permitiu confirmar os mapas de restrição e demonstrar para os fragmentos supranumerários pPF107, pPF144 e pPF66 a característica circular inicial. Estes são plasmídeos.

As tabelas 8, 9, 10 e 11 que se seguem descrevem os Perfis de restrição obtidos para os fragmentos pPF144, pPF107, pPF66 e pPF72.

Tabela 8

Fragmentos de restrição obtidos com o plasmídeo pPF144.

| Enzimas de restrição | Número de fragmentos | Tamanho em Kb |
|----------------------|----------------------|---------------|
| ApaI BamHI           | 2                    | 86, 58        |
| ApaI BglI            | 3                    | 50, 50, 44    |
| ApaI SalI            | 2                    | 79, 65        |
| ApaI SacII           | 2                    | 86, 58        |
| ApaI SmaI            | 2                    | 127, 17       |
| SacII BglI           | 3                    | 94, 36, 14    |
| SacII SalI           | 2                    | 137, 7        |
| SacII ApaI           | 2                    | 86, 58        |
| SacI ApaI            | 2                    | 103, 41       |
| SacI BamHI           | 1                    | 144           |

(A primeira enzima (ApaI ou SacII) é a utilizada para linearizar o plasmídeo pPF144, quando da digestão do DNA total do transconjugante. A segunda enzima foi utilizada para digerir o fragmento obtido quando da digestão com a primeira enzima).

Tabela 9

Fragmentos de restrição obtidos com o plasmídeo pPF107.

| Enzimas de restrição | Número de fragmentos | Tamanho em Kb |
|----------------------|----------------------|---------------|
| Apa I SalI           | 3                    | 64, 27, 16    |
| ApaI BamHI           | 3                    | 71, 27, 9     |
| ApaI BglI            | 3                    | 77, 27, 3     |
| ApaI SmaI            | 2                    | 91, 16        |
| ApaI SacII           | 3                    | 80, 17, 10    |
| BglI SalI            | 2                    | 61, 43        |
| BglI BamHI           | 2                    | 98,6          |
| BglI ApaI            | 2                    | 77, 27        |
| BglI SmaI            | 2                    | 61,43         |
| BglI SacII           | 2                    | 87, 17        |

(A primeira enzima (ApaI ou BglI) é a utilizada para linearizar o plasmídeo pPF107, quando da digestão do DNA total do transconjugante. A segunda foi utilizada para digerir o fragmento obtido quando da digestão com a primeira enzima).

Tabela 10

Fragmentos de restrição obtidos com o plasmídeo pPF66.

| Enzimas de restrição | Número de fragmentos | Tamanho em Kb |
|----------------------|----------------------|---------------|
| ApaI Sall            | 4                    | 31, 26, 7, 2  |
| ApaI BamHI           | 2                    | 45, 21        |
| ApaI BglI            | 2                    | 33, 33        |
| BamHI Sall           | 4                    | 26, 19, 12, 9 |
| BamHI ApaI           | 2                    | 45, 21        |
| BamHI BglI           | 2                    | 54, 12        |

(A primeira enzima (ApaI ou BamHI) é a utilizada para linearizar o plasmídeo pPF66, quando da digestão do DNA total do transconjugante. A segunda enzima foi utilizada para digerir o fragmento obtido após digestão com a primeira enzima).

Tabela 11

Fragmentos de restrição obtidos com o plasmídeo pPF72.

| Enzima de restrição | Número de fragmentos | Tamanho em Kb    |
|---------------------|----------------------|------------------|
| ApaI SalI           | 5 ou 4               | 31, 26, 11, 2, 2 |
| ApaI BamHI          | 3                    | 42, 21, 9        |
| ApaI SacI           | 2                    | 45, 27           |
| ApaI SacI           | 2                    | 62,5, 9,5        |

Estes perfis de restrição permitiram principalmente estabelecer mapas de restrição dos fragmentos pPF144, pPF107, pPF66 e pPD72, representados respectivamente nas figuras 1, 2, 3 e 4, os números em frente aos sítios de restrição simbolizam o número de Kb a partir do sítio ApaI, considerado arbitrariamente como origem. Nestas figuras estão representadas na mesma direcção os sítios que a sensibilidade do método de análise não permitiu separar.

b) Perfil de restrição do fragmento supranumerário pPF118.

O fragmento supranumerário pPF118 já digerido por ApaI foi submetido a uma digestão simples com a ajuda das enzimas BamHI, XhoI, BglII e SalI. A tabela 12 que se segue mostra os perfis de restrição obtidos.

Tabela 12

Tamanho dos fragmentos (Kb) obtidos por digestão do fragmento pPF118 (já digerido por ApaI).

pPF118

| BamHI | XhoI | BglI | SalI |
|-------|------|------|------|
| 66    | 95   | 71   | 46   |
| 36    | 26   | 28   | 42   |
| 16    |      | 17   | 36   |
|       |      | 16   | 23   |
|       |      | 15   |      |

c) Característica plasmídica dos fragmentos pPF72 e pPF118:

Foi possível limpar as estirpes S45-94 clone 1 e S45-77 clone 6 dos fragmentos pPF72 e pPF118 (cf. tabela 3 acima do exemplo 2), o que mostra a característica extracromossômica destes fragmentos. Por outro lado constatou-se por análise com a ajuda da técnica de electroforese em pulso de campo a ausência do fragmento linear no DNA genómico não digerido destas estirpes e a presença de fragmentos lineares pPF72 e pPF118 no DNA genómico destas estirpes digerido por ApaI. Estes dois fragmentos extra cromossômicos estão portanto na forma circular nas estirpes S45-94 clone 1 e S45-77 clone 6.

Os fragmentos supranumerários pPF72 e pPF118 são portanto igualmente plasmídeos.

d) Localização do gene da P- $\beta$ -galactosidase nos plasmídeos pPF144 e pPF107 - Presença deste gene no plasmídeo pPF118 e ausência do mesmo nos plasmídeos pPF66 e pPF72.

O gene da P- $\beta$ -galactosidase, enzima implicada no metabolismo da galactose, deve estar presente nos plasmídeos pPF144 e pPF107, portadores da característica Lac. O gene foi clonado por B. BOIZET et al., no plasmídeo pUCB25 (B. BOIZET et al., (1988) Gene, 249-261). Este último foi utilizado como sonda para localizar por hibridação o gene da P- $\beta$ -galactosidase nos plasmídeos referidos.

Mostrou-se assim que o gene da P- $\beta$ -galactosidase está situado nos plasmídeos pPF114 e pPF107 na parte que compreende o sítio ApaI. Este resultado não é de espantar pois a sequência publicada deste gene (B. BOIZET et al., (1988) Gene, 62, 249-261) compreende um sítio ApaI.

A aplicação da técnica descrita atrás ao fragmento pPF118 e aos plasmídeos pPF66 assim como pPF72 permitiu por outro lado verificar a presença do gene da  $\beta$ -galactosidase no plasmídeo pPF118 e a sua ausência nos plasmídeos pPF66 e pPF72.

#### Exemplo 5:

Caracterização parcial dos mecanismos de resistência aos fagos -  
Termo-sensibilidade - Estudo da adsorção fágica.

1) Termo-sensibilidade dos mecanismos de resistência:

Com a finalidade de determinar a resistência à temperatura destes diferentes mecanismos de resistência aos fagos, realizou-se o teste seguinte nos transconjugantes:

As bactérias a testar foram crescidas até uma fase exponencial de crescimento ( $DO_{600} = 0,5$ ). Depois estas bactérias foram aquecidas à temperatura que se queria testar durante 15 minutos assim como as caixas do meio gelosado. Em seguida um tapete destas bactérias foi colado com gelose mole contendo  $CaCl_2$  10 mM e gotas de fagos a diferentes diluições foram colocadas sobre este tapete. A caixa de Petri foi em seguida imediatamente colocada à temperatura a testar numa estufa adequada.

A tabela 13 a seguir assemelha-se aos resultados obtidos para os títulos fágicos para os 5 transconjugantes retidos em 1) e para a estirpe testemunha S45 (testemunha) a uma temperatura de 30°C e de 40°C.

TABELA 13

Resistência aos fagos dos transconjugantes Lac<sup>+</sup> às temperaturas de 30°C e 40°C

| Estirpe         | Fago (30°C)                                                            |                  |                     | Fago (40°C)        |                  |                     |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------|---------------------|
|                 | Título fágico (número de fagos/ml) /<br>diâmetro da placa de Lyse (mm) | 024<br>[grupo I] | 053<br>[grupo I]    | 059<br>[grupo III] | 024<br>[grupo I] | 053<br>[grupo I]    |
| S45-91 clone 1  |                                                                        | 0/0              | $4,10^7 / <0,25$    | 0/0                | $6,10^6 / <0,25$ | $2,10^8 / <0,25$    |
| S45-96 clone 1  |                                                                        | 0/0              | 0/0                 | 0/0                | $9,10^8 / 2$     | $2,10^{10} / 3$     |
| S45-77 clone 6  |                                                                        | $8,10^7 / <0,25$ | $2,10^{10} / <0,25$ | 0/0                | $2,10^9 / <0,25$ | $2,10^{10} / <0,25$ |
| S45-114 clone 1 |                                                                        | $8,10^6 / <0,25$ | $2,10^9 / <0,25$    | 0/0                | $9,10^8 / <0,25$ | $4,10^8 / <0,25$    |
| S45-94 clone 1  |                                                                        | 0/0              | $10^{10} / <0,25$   | 0/0                | 0/0              | $2,10^8 / <0,25$    |
| S45             |                                                                        | $2,10^9 / 2$     | $2,10^{10} / 3$     | $3,10^9 / 2$       | $2,10^9 / 2$     | $2,10^{10} / 3$     |

46 -

Constata-se que pela leitura da tabela acima que:

- A estirpe S45-96 clone 1, totalmente resistente aos fagos à temperatura de 30°C torna-se praticamente tão sensível como a estirpe testemunha a uma temperatura de 40°C. O mecanismo de resistência aos fagos em questão é portanto termosensível.

- As estirpes S45-91 clone 1, S45-77 clone 6 e S45-114 clone 1 têm uma resistência (parcial) aos fagos a uma temperatura de 40°C inferior à que têm a uma temperatura de 30°C. Os mecanismos de resistência aos fagos transportados por estas estirpes são portanto medianamente termo-sensíveis.

- A estirpe S45-94 clone 1 é tão resistente a uma temperatura de 40°C como a uma temperatura de 30°C. O seu mecanismo de resistência aos fagos é portanto pouco termo-sensível.

Os resultados descritos atrás deixam supor que diferentes tipos de mecanismos, alguns mais termo-sensíveis que outros, estão implicados na resistência aos fagos.

## 2) Estudo da adsorção fágica.

Cultivam-se culturas de bactérias durante a noite. Depois num tubo Eppendorf deitam-se:

- 600 µl de cultura de bactérias;
- 30 µl de  $\text{CaCl}_2$ , 1 M;
- 600 µl de fago (a  $10^5$ /ml).

O conjunto foi deixado na estufa a 30°C durante exactamente 12 min, depois a adsorção foi parada colocando o tubo

Eppendorf em gelo. O tubo foi centrifugado numa "microfuge" de tubos Eppendorf durante 5 min a 4°C para separar bactérias e fagos adsorvidos. O sobrenadante foi retirado, diluído a 4°C; o número de fagos não adsorvidos foi assim determinado em tapetes de estirpe S45.

Este teste foi realizado em 5 transconjugantes guardados e a estirpe S45 (testemunha) com os fagos Ø53 (grupo I de homologia), fago contra o qual os transconjugantes são parcialmente resistentes e com Ø59 (grupo III de homologia), fago contra o qual os transconjugantes são resistentes (cf. tabela 2 atrás).

Não foi constatada qualquer diferença de adsorção fágica significativa, contrariamente às observações de SANDERS M.E. et al., e de DE VOS W.M. et al. (SANDERS M.E. et al., (1983), Appl. Environ Microbiol. 46, 1125-1133 e DE VOS W.M. et al., (1984), Microbiol. Lett., 23, 175-178).

A adsorção fágica não está portanto implicada nos mecanismos de resistência transportados por estas estirpes.

#### Exemplo 6:

##### Deteccção de actividade bactericida

É interessante ter estirpes de lactococcus possuindo uma actividade bactericida (provocada por bacteriocinas) pois elas inibem o desenvolvimento de bactérias contaminantes. Procurou-se portanto actividades bactericidas nos transconjugantes guardados.

a) Protocolo.

7µl de uma cultura crescida durante a noite da estirpe estudada foram depositados numa caixa de meio gelosado sob a forma de uma gota. a incubação durou 16 h a uma temperatura óptima de crescimento. Depois neste meio foi espalhada a estirpe bacteriana sensível, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* S45, misturada com gelose mole a 50°C, meio e glucose a 0,4%. A incubação foi realizada novamente durante 16 horas. O aparecimento de um halo claro à volta da gota de cultura deixa supor a presença de uma bacteriocina (Van BELKUM et al., (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55, 1187-1191).

b) Resultados:

O protocolo descrito atrás foi realizado para as estirpes que se seguem:

- os transconjugantes (não limpos) S45-91 clone 1, S45-96 clone 1, S45-77 clone 6, S45-114 clone 1, S45-94 clone 1;

- o transconjugante limpo S45-114 clone 1 apresentando os fenótipos  $Rap^+ Lac^-$ ,  $Rap^- Lac^-$  e  $Rap^- Lac^+$  e o transconjugante limpo S45-94 clone 1 apresentando os fenótipos  $Rap^- Lac^-$  e  $Rap^+ Lac^-$ ;

- as estirpes dadoras S91, S94, S96, S114 e S77;

- a estirpe receptora S45 (testemunha).

As estirpes que se seguem apresentam uma actividade bactericida: as estirpes dadoras S94 e S114, os transconjugantes

S45-94 clone 1 e S45-114 clone 1, o transconjugante limpo S45-94 clone 1 apresentando o fenótipo  $Rap^+ Lac^-$ . Estes transconjugantes limpos ou não contendo todos um ou outro dos plasmídeos pPF72 e pPF66. Cada um destes possui portanto uma actividade bactericida.

Experiências complementares mostraram que as estirpes possuidoras do plasmídeo pPF66 são resistentes à actividade bactericida das estirpes possuidoras do plasmídeo pPF72 e vice-versa. Sabe-se que as bactérias são resistentes às bacteriocinas que elas próprias produzem. Os modos de acção dos mecanismos de resistência às bacteriocinas são portanto vizinhos.

#### EXEMPLO 7:

Clonagem de um fragmento do plasmídeo pPF144 com cerca de 3,3 Kb portador de um ou mais mecanismos de resistência a fagos

1) Clonagem de um fragmento do plasmídeos pPF144 com cerca de 3,3 Kb suposto portador de um ou mais mecanismos de resistência aos fagos.

O DNA do transconjugante S45-91 clone 1 (depositado na C.N.C.M. com o nº I-945 foi extraído, hidrolisado pela endonuclease *ApaI* e submetido a uma electroforese em pulso de campo nas condições descritas no exemplo 4. Em seguida o DNA linearizado do plasmídeo pPF144 foi extraído a partir do gel de electroforese obtido com ajuda do kit "geneclean" (Bio 101-La Jolla - Califórnia, Estados Unidos). A técnica de extracção utilizada neste kit consiste em dissolver a agarose com uma solução de iodeto de sódio, adsorver o DNA com uma suspensão de micropartículas de sílica, designada leite de sílica, centrifugar esta suspensão

eliminando o sobrenadante e pôr o DNA em solução com a ajuda de uma solução de Tris: 10 mM, EDTA : 10 mM, pH 8. Este DNA foi em seguida hidrolisado pelas enzimas de restrição EcoRI e HindIII, enzimas que previamente se constatou cortarem o plasmídeo pPF144 num grande número de fragmentos. O conjunto dos diferentes fragmentos de DNA obtido foi designado mistura A.

Por conseguinte, o plasmídeo não clivado pVAB38, já referido, que é portador de uma origem de replicação em E. coli, designada oric, e uma origem de replicação nos lactococcus, designada oris, assim como um gene de resistência à eritromicina, designado Ery<sup>R</sup>, foi hidrolizado por estas duas enzimas, ecoRI e HindIII, libertando assim 3 fragmentos: um fragmento HindIII-HindIII com cerca de 4,7 kb, designado fragmento B, contendo oris e Ery<sup>R</sup>, um fragmento EcoRI-HindIII com cerca de 1,5 kb, designado fragmento C contendo oric e um fragmento EcoRI-HindIII com cerca de 2 Kb. Estes 3 fragmentos foram separados num gel de electroforese e apenas dois entre eles, os fragmentos B e C foram recuperados. A purificação destes fragmentos foi realizada com o kit "geneclean". Estes dois fragmentos B e C não podem ligar-se de forma a dar um plasmídeo funcional pois as extremidades EcoRI e HindIII não são compatíveis. Para dar um plasmídeo funcional é necessário que estes dois fragmentos se associem a um terceiro fragmento com extremidades EcoRI e HindIII: esta abordagem é uma estratégia de clonagem orientada: apenas os plasmídeos possuidores de um novo fragmento EcoRI-HindIII serão seleccionados.

Os fragmentos B e C assim como a mistura A foram misturados: fez-se uma ligação do conjunto com a ajuda da DNA-ligase, depois uma transformação por electroporação da estirpe de E. coli DB11 (selecção em meio L + eritromicina a 25µg/ml). Obtiveram-se 3400 clones.

Após extracção do DNA de plasmídeo de 20 clones e digestão com EcoRI e HindIII, 18 de entre les possuem os fragmentos B e C e um terceiro fragmento visível em gel de agarose a 1%. Os 3400 clones foram misturados, o DNA de plasmídeo total foi extraído e serviu para transformar a estirpe de Lactococcus lactis ssp lactis S45 limpa do plasmídeo pVA838, designada estirpe S45d, de acordo com a técnica de transformação por formação e regeneração de protoplastos descrita por Von Wright et al., 1985, App. Env. Microbiol. 50, 1100-1102. O protocolo utilizado está descrito a seguir.

Protocolo de transformação dos lactococcus por formação e regeneração de protoplastos

100 µl de uma cultura crescida durante a noite serviu para semear 5 ml de meio M17 glucosado a 4 µ/l e o conjunto foi colocado na estufa até uma densidade óptica a 600 nm de 0,5. As células foram centrifugadas e colocadas em suspensão em 5 ml de tampão designado SMC: sacarose 0,5 M; maleato 20 mM; CaCl<sub>2</sub> 50 mM pH 6,5 a que se adicionou 4 mg/ml de lisozima. A incubação foi realizada durante duas horas a 37°C e em seguida as células foram centrifugadas a 25°C, lavadas com tampão SMC, centrifugadas novamente e colocadas em suspensão em 500 µl de tampão SMC: isto constitui a preparação de protoplastos. Em seguida adicionou-se por esta ordem num tubo Eppendorf estéril misturou-se entre cada adição:

- 5 µl de tampão SMC pH 6,5 (2 vezes)
- 5 µl de preparação de DNA em água desmineralizada
- 100 µl de protoplastos
- 330 µl de uma solução de polietilenoglicol com peso molecular médio de 6000 a 30% em tampão SMC

O conjunto foi incubado durante 10 min a 25°C depois adicionou-se 1 ml de tampão SMC para parar a acção do PEG (misturando docemente). As células foram centrifugadas. O sobrenadante foi rejeitado e adicionado 1 ml de meio M17 (descrito anteriormente) contendo 0,5 M de sacarose e glucose a 4 g/l. A expressão realizou-se durante 1 h a 30°C. As células foram centrifugadas. O sobrenadante foi quase totalmente rejeitado, o sedimento ressuspenso no líquido residual e misturado com agar mole fundido contendo glucose a 4 g/l, 5 µg/ml de eritromicina e sacarose 0,5 M; esta mistura foi espalhada sobre caixas de M17 gelosado (descrito anteriormente) adicionado de 0,5 M de sacarose e 4 g/l de glucose. As caixas foram colocadas na estufa em anaerobiose durante 4 a 5 dias. Os clones começam a aparecer ao fim de dois a três dias de incubação.

Obtiveram-se assim 215 clones: eles foram todos testados quanto à resistência ao fago φ59 de acordo com a técnica descrita anteriormente (cf. exemplo 4). Um único clone mostrou-se resistente a este fago. A resistência aos fagos deste clone é idêntica à observada no transconjugante S45-91 clone 1: resistência total ao fago φ59 do grupo III e resistência parcial ao fago φ53 do grupo I. Após extracção do plasmídeo contido nesta estirpe, designado plasmídeo pPF 144-1, foi feito o seu mapa de restrição. Ele está apresentado na Figura 5, os algarismos face aos sítios de restrição simbolizam o número de kilobases a partir de um sítio HindIII, considerado arbitrariamente como origem. Constata-se a presença dos fragmentos B e C provenientes do vector pVA838 de um fragmento HindIII-HindIII com cerca de 3,3 Kb, designado fragmento D, suposto portador de um ou mais mecanismos de resistência aos fagos, esta característica sendo designada Rap, assim como um fragmento EcoRI-HindIII com cerca de 0,2 Kb designado fragmento E, os fragmentos D e E provenientes da mistura A.

2) Verificação de que o fragmento D é portador de um ou mais mecanismos de resistência aos fagos

1. Para confirmar que o plasmídeo pPF144-1 confere resistência aos fagos, este plasmídeo foi extraído segundo a técnica descrita no exemplo 4, depois serviu para transformar por electroporação a estirpe E. coli DB11. A estirpe transformada obtida foi designada estirpe DB11 pPF144-1. Numa segunda fase, este plasmídeo foi extraído da estirpe DB11 pPF144-1 e serviu para transformar a estirpe S45d: confirmou-se então que a estirpe transformada apresenta a mesma resistência aos fagos.

2. Com a finalidade de confirmar que o fragmento D confere resistência aos fagos, o fragmento D foi inserido no plasmídeo pVAB38 da seguinte forma: o plasmídeo pVAB38 foi hidrolizado com a ajuda da endonuclease HindIII; adicionou-se o fragmento D aos dois fragmentos obtidos, efectuou-se então uma ligação com a ajuda da DNA-ligase e transformou-se por electroporação a estirpe E. coli DB11; extraiu-se os plasmídeos de vinte clones. Apenas um de entre eles possui os dois fragmentos HindIII-HindIII de pVAB38 e o fragmento D. Estabeleceu-se o mapa de restrição do plasmídeo pPF144-2. Ele está representado na Figura 6. Após transformação da estirpe S45d, verificou-se que a estirpe transformada, designada estirpe S45d pPF144-2 é resistente aos fagos, portanto o fragmento D confere resistência aos fagos. Sabendo-se que o fragmento está rodeado por 2 sítios HindIII, a sua orientação não é conhecida nos plasmídeos pPF144-1 e pPF144-2.

A estirpe DB11 pPF144-1 foi depositada na C.N.C.M. em 9 de Abril de 1991 com o número I-1070.

### 3) hibridação com o fragmento D

O DNA de cada um dos transconjugantes obtidos foi extraído, hidrolizado pela enzima de restrição *Apal*, depois submeteu-se a uma electroforese em pulso de campo como descrito no exemplo 4. Após desnaturação deste DNA com a ajuda de soda e secagem do gel, efectuou-se a hibridação com o fragmento D nas condições clássicas de Southern Blot (Maniatis, referido atrás). Constatou-se assim que cada um dos plasmídeos pPF144, pPF107, pPF118, pPF72 e pPF66 hibrida com o fragmento D (o sinal obtido com o plasmídeo pPF144 é muito mais intenso do que com outros plasmídeos).

## REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a obtenção de uma molécula de ADN compreendendo um mecanismo de resistência aos fagos, caracterizado por se proceder à selecção das moléculas de ADN que contêm uma parte funcional do fragmento HindIII-HindIII de cerca de 3,3 kb do plasmídeo pPF144-1 presente na estirpe depositada na C.N.C.M. sob o nº I-1070.

2ª. - Plasmídeo compreendendo pelo menos um mecanismo de resistência aos fagos, caracterizado por ser uma molécula de acordo com a reivindicação 1.

3ª. - Plasmídeo compreendendo pelo menos um mecanismo de resistência aos fagos, caracterizado por ser susceptível de estar contido nos transconjugantes derivados do crescimento de uma estirpe dadora escolhida entre as estirpes:

- estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM com os nº I-939 e I-943,
- estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940,
- estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM com os nº I-941 e I-942,

e de uma estirpe receptora.

4ª. - Plasmídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por ser susceptível de hibridar com a molécula de ADN de acordo com a reivindicação 1.

5ª. - Plasmídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o ou os mecanismos de resistência aos fagos conferir(em), a uma temperatura de 30°C, uma resistência parcial ou total contra os fagos do grupo I de homologia e os fagos do grupo III de homologia.

6ª. - Plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado por compreender igualmente um ou mais genes que conferem à bactéria láctica que o contem uma actividade bactericida.

7ª. - Plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 3 a 6, caracterizado por ter as características de um plasmídeo escolhido entre:

- o plasmídeo pPF66 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositado na CNCM com o nº I-948,
- o plasmídeo pPF72 contido na estirpe Lactococcus lactis spp lactis depositado na CNCM com o nº I-946,
- o plasmídeo pPF107 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositado na CNCM com o nº I-947,
- o plasmídeo pPF118 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositado na CNCM com o nº I-944,
- o plasmídeo pPF144 contido na estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositado na CNCM com o nº I-945.

8ª. - Plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado por compreender igualmente um ou mais genes

que conferem à bactéria láctica que o contem, uma actividade bactericida.

9ª. - Plasmídeo, caracterizado por a sua sequência apresentar um grau de homologia elevado com e/ou compreendendo uma parte importante da sequência de um plasmídeo de acordo com a reivindicação 7.

10ª. - Plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado por a estirpe receptora ser a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis S45.

11ª. - Bactéria láctica resistente aos fagos, caracterizada por conter pelo menos um plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 2 a 10.

12ª. - Bactéria láctica de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por pertencer à espécie Lactococcus lactis.

14ª. - Bactéria láctica de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por ser escolhida entre as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis depositadas na CNCM com os nº I-944, I-945, I-946, I-947 e I-948.

15ª. - Processo para a utilização de uma estirpe escolhida entre as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis depositadas na CNCM com os nº I-944, I-945, I-946 e I-948, as estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris depositada na CNCM com os nº I-939 e I-943, a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940 e as estirpes Lactococcus lactis spp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM com os nº I-941 e I-942, para conferir um mecanismo de resistência aos fagos a uma estirpe de interesse industrial, caracterizado por a transmissão

do mecanismo de resistência aos fagos à referida estirpe de interesse industrial ser efectuada por conjugação, transformação, transdução, fusão de protoplastos ou outro método de transferência de genes.

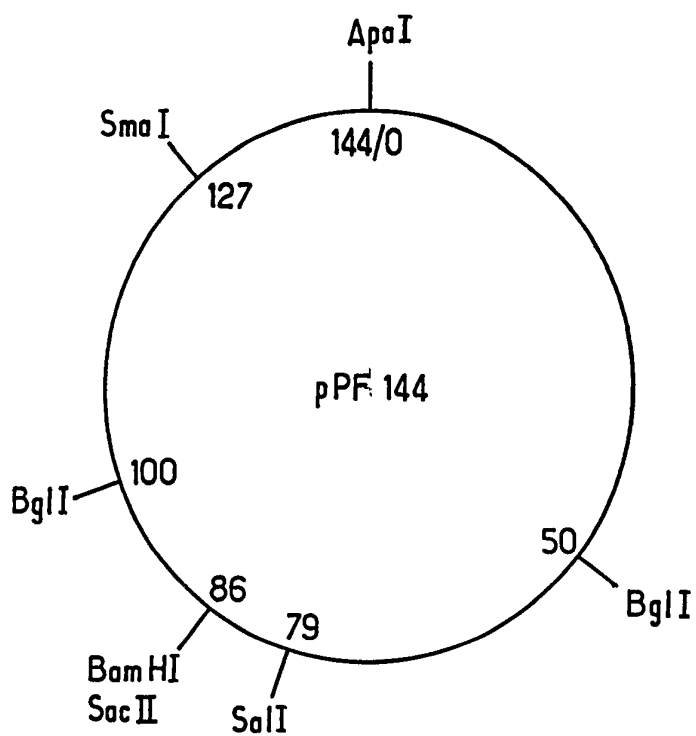
16ª. - Processo para a obtenção de uma estirpe com interesse industrial resistente aos fagos, portadora de um mecanismo de resistência aos fagos transferido segundo um processo que utiliza uma estirpe escolhida entre as estirpes Lactococcus lactis spp lactis depositadas na CNCM com os nº I-944, I-945, I-946, I-947 e I-948, as estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM com os nº I-939 e I-943, a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº I-940 e as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositada na CNCM com os nº I-941 e I-942, caracterizado por a transmissão do mecanismo de resistência aos fagos à referida estirpe de interesse industrial ser efectuada por conjugação, transformação, transdução, fusão de protoplastos ou outro método de transferência de genes.

17ª. - Processo para obter um plasmídeo de acordo com uma das reivindicações 2 a 10, caracterizado por se utilizar no referido processo uma estirpe escolhida entre as estirpes Lactococcus lactis ssp cremoris depositadas na CNCM com os nº D77 e D114, a estirpe Lactococcus lactis ssp lactis depositada na CNCM com o nº D91 assim como as estirpes Lactococcus lactis ssp lactis var. diacetylous depositadas na CNCM com os nº D94 e D96.

Lisboa, 12 de Abril de 1991

  
J. PEREIRA DA CRUZ  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.ª  
1200 LISBOA

FIGURA 1  
(6 Figuras)



**FIG. 1**

Plasmídeo pPF 144

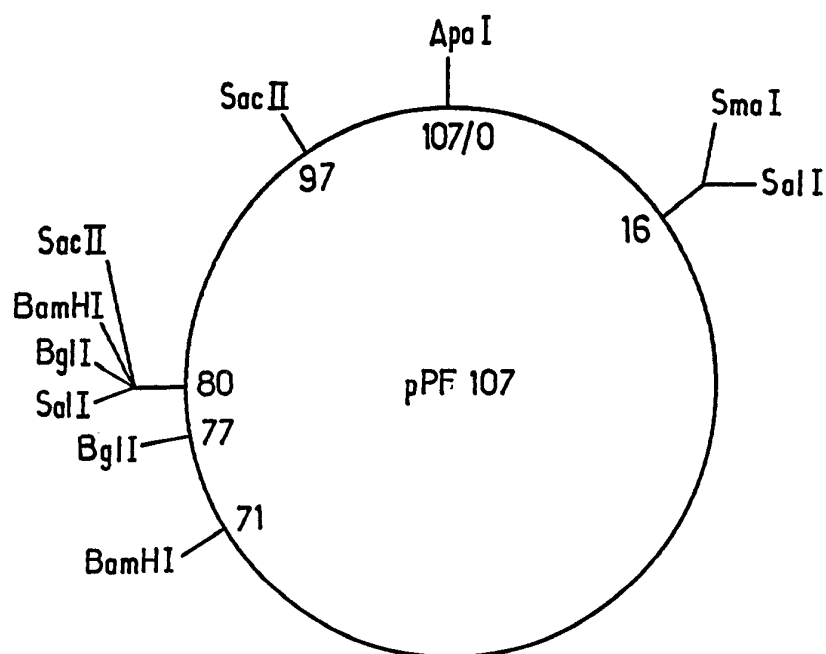
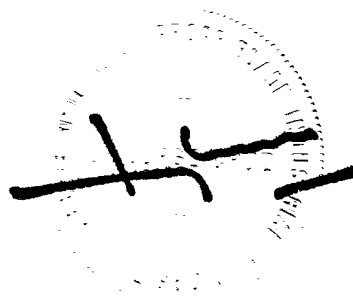
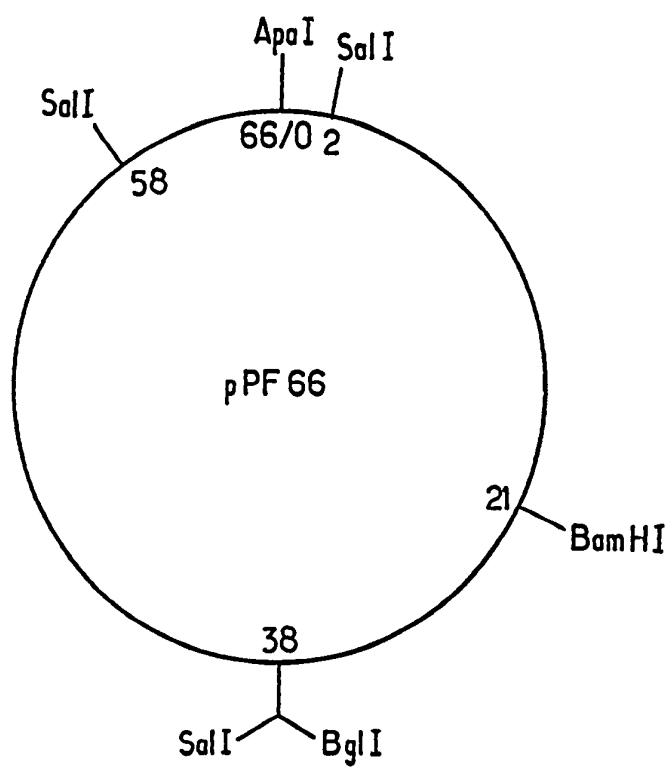


FIG. 2

Plasmídeo pPF 107

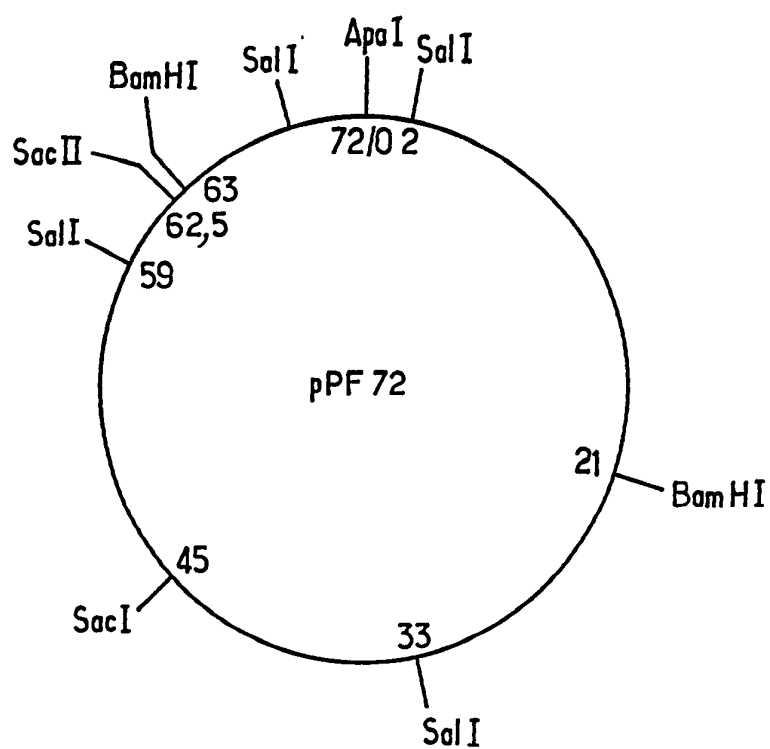
FIGURA 3  
(6 Figuras)



**FIG. 3**

Plasmídeo pPF66

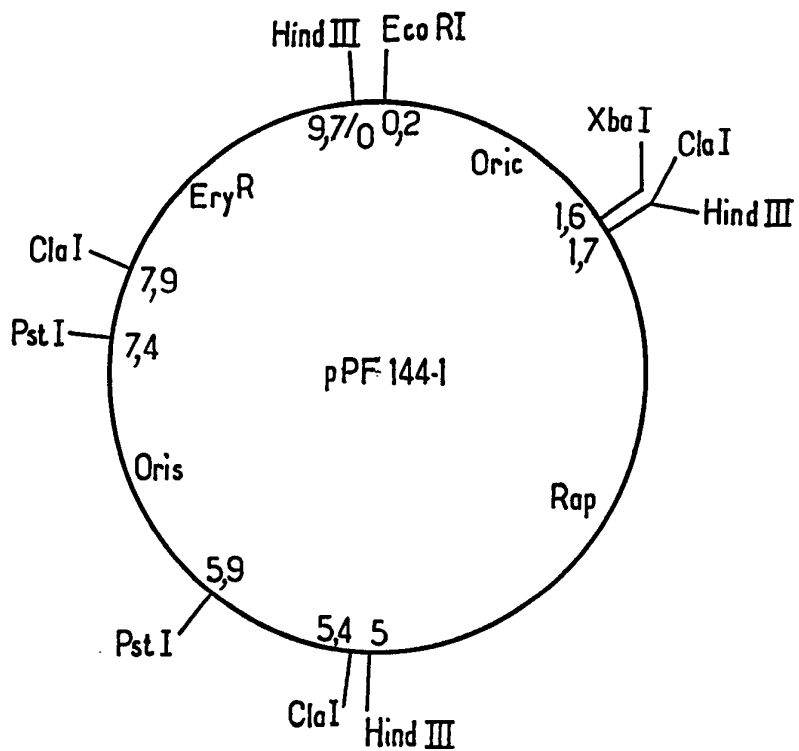
FIGURA 4  
(6 Figuras)



**FIG. 4**

Plasmídeo pPF 72

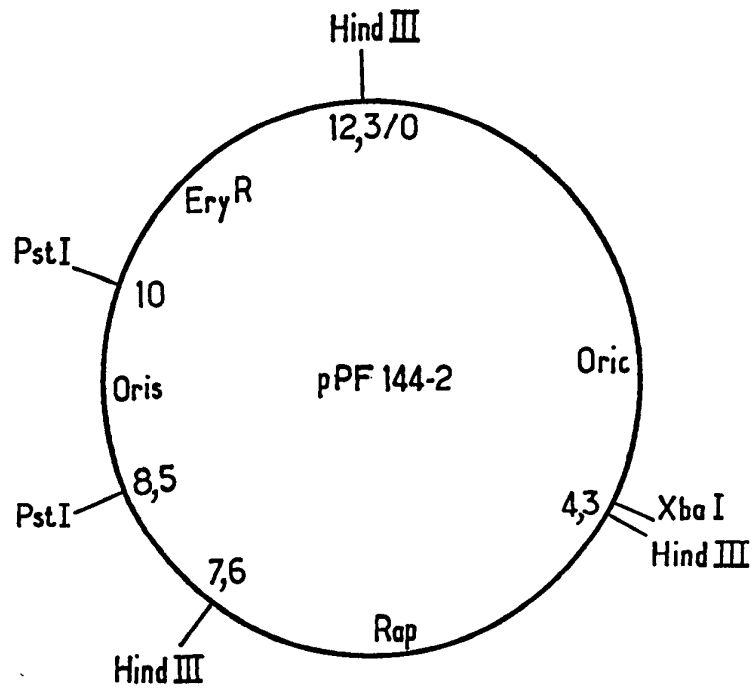
FIGURA 5  
(6 Figuras)



**FIG. 5**

Plasmídeo pPF 144-1

FIGURA 6  
(6 Figuras)



**FIG. 6**

Plasmídeo pPF 144-2