

30. Maria F. CANCELLIERI MASTROPIETRO e M. PRINCIVALLE. — Nuovo metodo microbiologico di dosaggio dell'adenina e della guanina per la determinazione dell'acido desossiribonucleico.

Riassunto. — Viene descritto un metodo che permette il dosaggio, in una singola prova, della guanina e dell'adenina per la determinazione dell'acido desossiribonucleico.

Il procedimento è basato sulla capacità, posseduta dall'adenina e dalla guanina, di riattivare la crescita di *B. megatherium* inibita dalla presenza nel terreno di coltura della 8-aza-2,6-diaminopurina, noto antagonista delle basi puriniche. Vengono descritte tecniche in terreno solido e liquido. Il metodo è specifico per le basi puriniche libere o loro nucleotidi. In terreno solido è sensibile a 5 mcg/cm³ di basi libere e in terreno liquido a 0,4 mcg; è possibile titolare quindi, in terreno solido, il DNA di un campione che lo contenga in quantità di 20 mcg/cm³, mentre la sensibilità in terreno liquido permette di dosare circa 0,5 mcg/cm³ di DNA.

Per ottenere le basi libere dal DNA si procede all'idrolisi acida (HCl 2N a 120° per 40 min).

Summary. — The method described permits the determination of DNA by the quantitative assay, in a single test, of adenine and guanine as free bases.

The procedure is based on the ability of adenine and guanine of reactivating the growth of *B. megatherium* inhibited by the presence, in the culture medium, of 8-aza-2,6-diaminopurine, an antagonist of purine bases. Techniques in both solid and liquid medium are described.

The method is specific for the free purine bases or its nucleotides; in solid medium its sensitivity permits the determination of 5 µg of free bases (20 µg of DNA) and in liquid medium of 0.4 µg of free bases (0.5 µg of DNA).

In order to obtain the free bases, acid hydrolysis (HCl 2N at 120° for 40 min) is sufficient.

Per la determinazione quantitativa del DNA possono essere impiegati metodi chimici o microbiologici. I metodi chimici si basano: sulla determinazione del fosforo; sulla determinazione dello zucchero (desossiribosio); sulla determinazione delle basi puriniche o pirimidiniche. Un'analisi critica dei metodi chimici esula dall'argomento di questo la-

voro; ricorderemo soltanto che essi presentano alcune limitazioni, soprattutto in rapporto all'interferenza di alcune sostanze estranee alla composizione del DNA.

Tra i metodi microbiologici destinati più specificamente alla determinazione del DNA, alcuni sono basati sul dosaggio dei desossiribosidi, altri sulla determinazione delle basi pirimidiniche e soprattutto della timina.

Metodi basati sul dosaggio dei desossiribosidi. — HOFF-JORGENSEN ⁽¹⁾ ha proposto un metodo in cui si utilizza un microrganismo (*Thermobacterium acidophilus* R26), che richiede specificamente per la crescita i desossiribosidi, sia che si tratti di desossinucleotidi o di desossinucleosidi della timina, guanina, adenina, uracile, citosina, ipoxantina, metilcitosina e idrossimetilcitosina, mentre sono inattive le basi libere.

Procedimenti che utilizzano *Thermobacterium acidophilus* e che rappresentano modificazioni di quello proposto da HOFF-JORGENSEN sono stati descritti da MILLER ⁽²⁾ e SCHNEIDER ⁽³⁾.

I metodi che abbiamo citato si valgono di terreni liquidi piuttosto complessi e richiedono una laboriosa preparazione del campione onde depolimerizzare il DNA a desossiribosidi.

Metodi basati sul dosaggio della timina. — ELSON e CHARGAFF ⁽⁴⁾ hanno proposto per il dosaggio del DNA l'uso di un mutante di *Escherichia coli* (*E. coli* T (—), ATCC 14417) che richiede per la crescita timina (oppure timidina o acido timidilico). Con questo metodo si possono dosare fino a 0,1 mcg di timina. Modificazioni sono state proposte da TRAVAGLINI e SCHUTZ e da ZAMENHOF ⁽⁵⁾. L'impiego di questi metodi implica l'idrolisi completa del DNA: con qualunque metodo tale idrolisi venga effettuata, essa comporta una parziale distruzione della timina, e di ciò bisogna tener conto nel dosaggio.

Un altro metodo basato sul dosaggio della timina è quello proposto da HOLMES e WELCH ⁽⁶⁾, in cui si impiega un ceppo di *Streptococcus faecalis* che risponde alla timina o alla timidina. Tale metodo si esegue in un terreno solido molto complesso, ed è sensibile a 0,5 mcg di timina.

Altri metodi, descritti da MERRIFIELD e DUNN ⁽⁷⁾ utilizzano *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus brevis*, che rispondono all'uracile e alla timina il primo, all'uracile e alla citosina il secondo.

Tutti i metodi basati sulla determinazione della timina possono essere applicati soltanto a condizione che si conosca preventivamente la percentuale della timina, percentuale che è variabile per ciascun DNA.

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo di dosaggio del DNA che fosse più specifico di quelli che abbiamo

riportato, sufficientemente sensibile, e che non richiedesse particolari attrezzature nè laboriose manipolazioni, sia per la preparazione del campione da esaminare, sia per la tecnica più strettamente microbiologica del dosaggio. Tale scopo è stato conseguito attraverso un procedimento mediante il quale è possibile determinare quantitativamente, con una unica prova, le basi puriniche (adenina e guanina) come basi libere, sfruttando il metodo degli antagonisti: questo metodo consiste nella possibilità di riattivare, mediante una determinata sostanza, la crescita di un microrganismo inibito da un antagonista della sostanza stessa.

Una semplice idrolisi acida libera per il 90-100% le basi puriniche dal DNA. Poichè la somma delle basi puriniche rappresenta una frazione costante del DNA, è sufficiente conoscere questo dato per risalire all'esatto contenuto del DNA di un campione.

PARTE SPERIMENTALE

Azione degli antagonisti delle basi puriniche e pirimidiniche sui microrganismi. — Seguendo uno schema di lavoro già da noi adottato nella ricerca di metodi di dosaggio degli aminoacidi ⁽⁸⁾ e della tiamina ⁽⁹⁾, abbiamo analizzato una serie di microrganismi per individuare dei ceppi che fossero suscettibili di venire inibiti da antimetaboliti noti delle basi puriniche o pirimidiniche e riattivati in maniera specifica dalle basi puriniche o pirimidiniche stesse, rispettivamente.

E' stata così saggiata l'attività inibente di alcuni antagonisti delle basi puriniche (8-aza-2,6-diaminopurina; 6-mercaptopurina; 2-amino-4,6-diossipurina; 8-azaadenina; 2-tioadenina; 8-azaguanina) nonché di alcuni antagonisti delle basi pirimidiniche (5-amino-2,4-diossipirimidina; 6-azatimina; 5-bromouracile; 6-azauracile; 2-tiouracile) su 21 ceppi batterici.

Nella tabella 1 sono riportati i risultati di tale esperienza. Da essa risulta che gli antimetaboliti attivi sui ceppi presi in esame sono: fra gli antagonisti delle basi pirimidiniche il 6-azauracile e il 2-tiouracile, inibitori dell'uracile; questi però non sono utili per la caratterizzazione del DNA e potranno servire per il dosaggio dell'RNA. Tra gli antagonisti delle basi puriniche sono attive l'8-azaguanina, l'8-azaadenina e l'8-aza-2,6-diaminopurina. Quest'ultimo composto ci è sembrato l'inibitore più adatto e pertanto abbiamo con esso proseguito le nostre esperienze, usando come microrganismo test *Bacillus megatherium* 136. Questo microrganismo, inibito dall'8-aza-2,6-diaminopurina, viene riattivato dalla guanina, dall'adenina e da alcuni loro derivati; non hanno alcun effetto le basi pirimidiniche (v. tab. 2).

In un'altra esperienza è stata saggiata comparativamente l'attività

Inibizione della crescita esercitata da antagonisti delle basi puriniche e pirimidiniche

ceppi batterici *	6-mercaptopurina	8-aza2,6-diamino purina	8-azadenina	2-tioadenina	8-azaguanina	2-amino-4,6 diossipirimidina	5-amino-2,4 diossipirimidina	6-azatimina	5-bromouracile	6-azauracile	2-tiouracile
B25		—		—	+	—	—	—	—	+	—
B1		+		—	+	—	—	—	—	+	+
B22		—		—	+	—	—	—	—	+	—
B41		—		—	—	—	—	—	—	—	—
B4		—		—	+	—	—	—	—	+	+
B17		—		—	+	—	—	—	—	+	—
B20		—		—	—	—	—	—	—	+	—
B27		—		—	—	—	—	—	—	+	—
B130		—		—	—	—	—	—	—	+	—
B5		—		—	—	—	—	—	—	+	—
B7		—		—	—	—	—	—	—	+	+
B35		—		—	+	—	—	—	—	+	—
B132		—		—	—	—	—	—	—	+	—
B44	—	—	—		+	—	—	—	—	+	—
B139	—	—	+		+	—	—	—	—	+	—
B138	—	—	+		+	—	—	—	—	+	—
B136	—	+	—		+	—	—	—	—	+	+
B137	—	—	+		+	—	—	—	—	+	—
B135	—	—	—		+	—	—	—	—	+	—
B142	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—
B141	—	+	+		+	—	—	—	—	+	—

(*) B25 = *B. subtilis*; B1 = *Azotobacter agilis*; B22 = *Salmonella typhimurium*; B41 = *Aerobacter aerogenes*; B4 = *B. brevis*; B17 = *B. subtilis*; B20 = *B. subtilis*; B27 = *E. coli*, B130 = *Klebsiella* sp; B5 = *K. pneumoniae*; B7 = *B. brevis*; B35 = *B. subtilis*; B132 = *Staph. sp*; B44 = *B. licheniformis*; B139 = *B. subtilis*; B138 = *B. subtilis*; B136 = *B. megatherium*; B137 = *B. subtilis*; B135 = *B. licheniformis*; B142 = *B. laterosporum*; B141 = *B. polymixa*.

TABELLA 2

Riattivazione della crescita di *B. megatherium* 136 dopo inibizione mediante 8-aza-2,6-diaminopurina (4 mcg/cm³)

adenina	+	GDP	—
adenosina	+	GTP	—
desossiadenosina	+	ipoxantina	—
acido adenilico	—	acido urico	—
AMP5'	—	uracile	—
ADP	—	uridina	—
ATP	—	UMP5'	—
ADPR	—	UDP	—
guanina	+	citosina	—
guanosina	—	citidina	—
desossiguanosina	+	CMP5'	—
acido guanilico	+	CDP	—
GMP5'	+	CTP	—

TABELLA 3

Entità della riattivazione della crescita da parte delle basi puriniche e loro derivati su *B. megatherium*, inibito dalla 8-aza-2,6-diaminopurina (4 mcg/cm³)

composti	concentrazione M/2700
adenina	31,7 mm (1)
adenosina	20,5 mm
desossiadenina	29,5 mm
guanina	32,0 mm
desossiguanosina	21,0 mm
acido guanilico	19,2 mm
GMP5'	15,2 mm

(1) I numeri indicano il diametro degli aloni di crescita.

della guanina e dell'adenina nel riattivare la crescita di *B. megatherium* 136 inibito dall'8-aza-2,6-diaminopurina, sia in terreno liquido che in terreno solido. Come risulta dalla tabella 3, la capacità di riattivare la crescita è posseduta nella stessa misura, a parità di concentrazione, dall'adenina e dalla guanina.

Una certa azione è posseduta dai nucleosidi e nucleotidi delle due basi puriniche; tuttavia, come sarà specificato più oltre, questi composti non interferiscono nella determinazione del DNA quando questo è sottoposto all'idrolisi acida, mediante la quale dai nucleotidi e dai nucleosidi si liberano le basi.

MATERIALI E MODALITA' TECNICHE

1. *Microrganismo titolatore.* — E' un ceppo di *Bacillus megatherium* classificato nella nostra collezione con la sigla B136.

2. *Preparazione della semina.* — Abbiamo usato una sospensione di spore preparate nel seguente modo: si sospende in soluzione fisiologica la patina di un'agar-coltura di 5-6 giorni e la si riscalda a 70°C per 15 min in modo da uccidere le forme vegetative presenti. Si lava per centrifugazione e si risospende in soluzione fisiologica in modo da avere una concentrazione finale di $2,5 \times 10^8$ spore per cm³. Questa sospensione può essere conservata in frigorifero per diversi mesi.

3. *Soluzione standard.* — Poichè, come risulta dalle esperienze surriferite, la capacità di riattivare la crescita è posseduta in egual misura dall'adenina e dalla guanina a parità di concentrazione, abbiamo preferito usare come standard una sola di queste sostanze, e precisamente l'adenina per la sua maggiore solubilità in acqua. Le concentrazioni per la titolazione in terreno solido col metodo « dei 4 punti » sono di 10 e di 50 mcg/cm³.

4. *Terreno di prova.* — E' così composto: K₂HPO₄ g 7; KH₂PO₄ g 3; Na₃-citrato g 0,5; Mg SO₄ g 0,1; (NH₄)₂ SO₄ g 1; glucosio g 2; idrolizzato di caseina (*Vitamin free casamino acids*, Difco) g 0,1; agar (Difco) g 15; H₂O bidistillata a cm³ 1000; pH 7.

5. *Allestimento della prova.* — All'agar sciolto e raffreddato a 45°C si aggiunge la sospensione di semina, già descritta, in ragione del 2,5% in volume (6×10^6 spore/cm³ di agar), nonchè il 5% di una soluzione di 8-aza-2,6-diaminopurina 3×10^{-3} M (ottenuta sciogliendo 80 mg di sostanza in 1 litro di acqua distillata). Si versa l'agar-germi-inibitore in piastre (di dimensioni adatte al numero dei campioni da titolare) in mo-

do da ottenere uno strato di 4 mm; si lascia solidificare e poi si dispongono sulla superficie i cilindretti di porcellana con le varie diluizioni dello standard e del campione. Si porta in termostato a 37°C per 24 h.

RISULTATI

1. *Specificità della risposta alle basi puriniche.* — Come abbiamo già osservato, e come risulta dalle tabelle 2 e 3, la riattivazione della crescita di *B. megatherium* inibito dalla 8-aza-2,6-diaminopurina è possibile solo ad opera della guanina, dell'adenina, e di alcuni loro nucleotidi e nucleosidi. Sono del tutto inattive le basi pirimidiniche e i loro derivati.

Sono risultati altresì inattivi una serie di composti che non hanno alcun rapporto strutturale con le basi suddette: abbiamo infatti saggiato una serie di 18 aminoacidi e 8 vitamine del gruppo B.

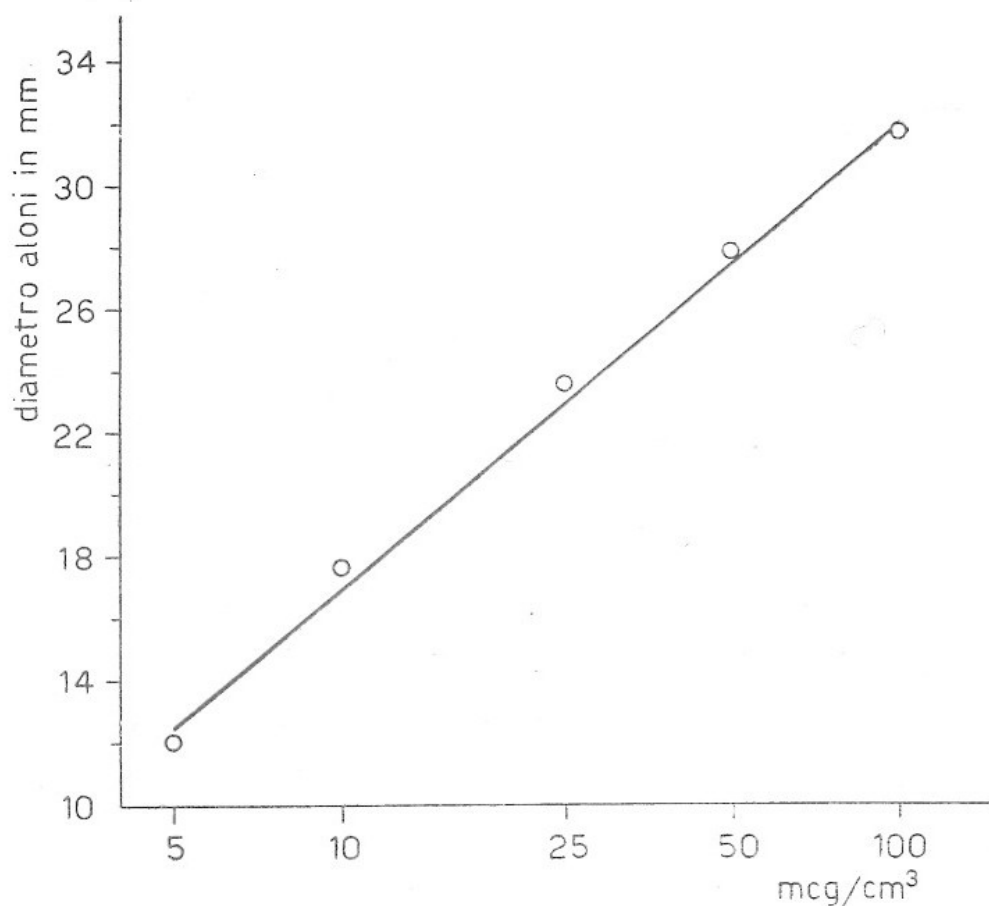


Fig. 1. - Risposta di *B. megatherium* all'adenina in terreno contenente 8-aza-2,6-diaminopurina. Sull'asse delle ascisse, logaritmo delle concentrazioni di adenina; sull'asse delle ordinate, diametro degli aloni di crescita in mm.

2. *Curva di taratura.* — La curva di taratura da noi costruita dimostra che nelle condizioni del nostro esperimento (4 mcg di inibitore e 6×10^6 cellule per cm³ di terreno) il diametro degli aloni di crescita

varia linearmente col logaritmo della dose nell'ambito compreso tra 5 e 100 mcg di adenina per cm^3 (v. fig. 1). Gli aloni di crescita prodotti dalle soluzioni di adenina e da quelle di guanina, hanno, a parità di concentrazione, diametri della stessa misura (fig. 2). Inoltre miscugli

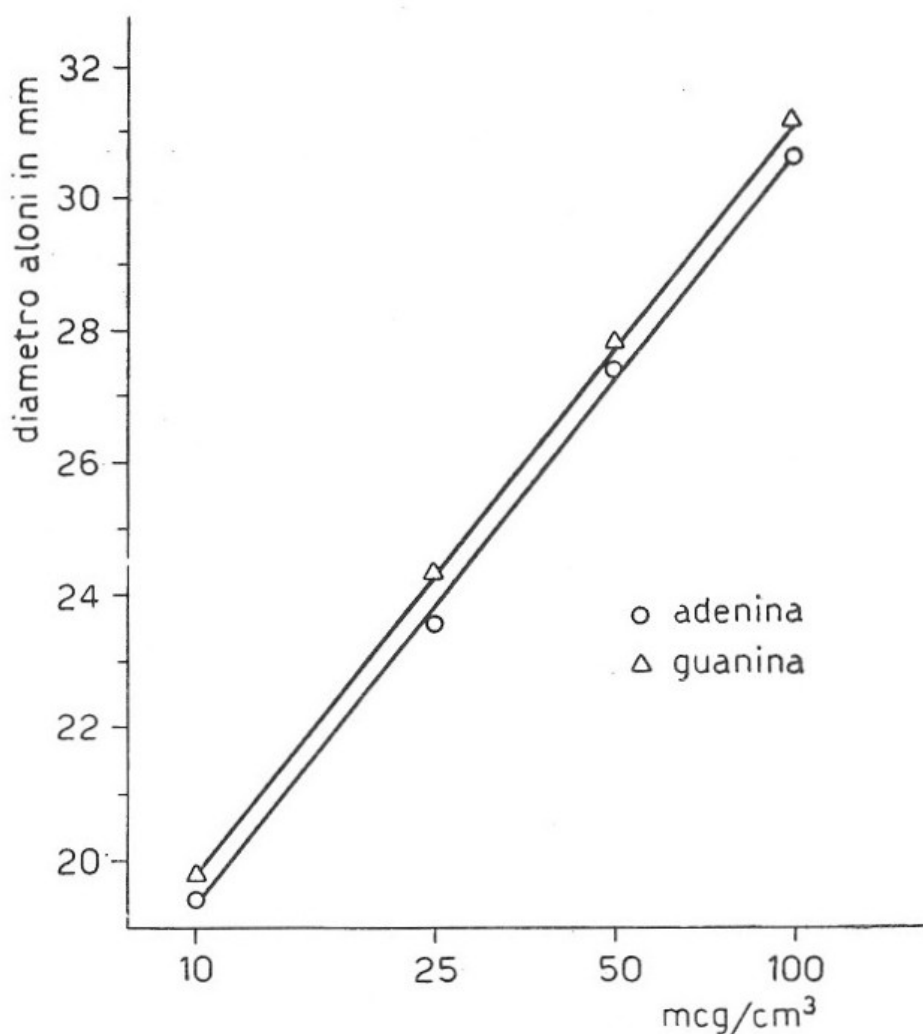


Fig. 2. - Risposta di *B. megatherium* a varie concentrazioni di adenina e guanina.

contenenti le due sostanze in varie proporzioni, posseggono, alla stessa concentrazione complessiva, la medesima attività di soluzioni contenenti le sostanze singole.

3. *Sensibilità del metodo.* — Usando come standard, col metodo « dei 4 punti », soluzioni di adenina, è possibile determinare quantitativamente adenina, guanina e miscugli delle 2 sostanze in materiali che le contengano in quantità minime di 5 mcg/cm^3 .

4. *Determinazione quantitativa del DNA.* — Come abbiamo già rilevato, la riattivazione del microrganismo-test avviene solo ad opera delle basi puriniche o dei loro nucleosidi.

Per effettuare una determinazione quantitativa di un campione di DNA è perciò necessario idrolizzare il DNA in modo da ottenere le basi

libere. Da alcune prove da noi effettuate risulta che la massima liberazione si ottiene mediante idrolisi acida con HCl 2 N a 120°C per 40 min. Con questo trattamento si ottiene dal 90 al 100% della resa teorica in basi puriniche. Nella tabella 4 sono illustrati i risultati ottenuti con l'idrolisi acida condotta a varie temperature, con tempi diversi.

TABELLA 4

HCl 2N	DNA mcg/cm ³	contenuto teorico basi puriniche mcg/ml	dati sperimentali (adenina + guanina) mcg/ml	rendimento medio %
60 min. a 100°	7000	1520	1210	80
120 min. a 100°	13.500	2900	2366	81
40 min. a 120°	2000	434	440	100
60 min. a 120°	3400	738	750	100

Per risalire al contenuto di DNA di un campione, una volta conosciuta la quantità di basi puriniche liberate dall'idrolisi, sarà sufficiente un semplice calcolo in base ai pesi molecolari del DNA e delle basi puriniche in esso presenti: poichè il peso molecolare di un tetranucleotide di DNA è di 1307 e il peso delle basi puriniche in esso contenute è di

$$1307$$

284, sarà sufficiente moltiplicare per $\frac{1307}{284} = 4,6$ il titolo delle basi

puriniche.

Con questo metodo è possibile, in terreno solido, determinare il DNA di un campione che lo contenga nella quantità di 20-30 mcg per cm³.

Sono stati eseguiti alcuni saggi di recupero aggiungendo DNA idrolizzato a DNA polimerizzato: il recupero del DNA idrolizzato è stato del 95%.

5. *Titolazione in terreno liquido.* — Come abbiamo già detto, questo metodo è sensibile a 5-10 mcg di basi puriniche per cm³; tuttavia la sensibilità può essere ulteriormente incrementata effettuando il dosaggio in terreno liquido: usando concentrazioni dell'inibente di 3,2 mcg per cm³ di terreno basale è possibile aumentare di circa 50 volte la sensibilità (fino a 0,4 mcg di basi puriniche, e quindi fino a 0,5 mcg di DNA).

La composizione del terreno liquido (doppia concentrazione) è la seguente: K_2HPO_4 g 14; KH_2PO_4 g 6; Na_3 -citrato g 1; $MgSO_4$ g 0,2; $(NH_4)_2 SO_4$ g 2; vitamin free casaminoacids (Difco) g 0,05; glucosio g 4; H_2O cm³ 1000; pH 7.

Per l'esecuzione della prova, ad una serie di provette contenenti 2 cm³ di terreno si aggiungono quantità crescenti della soluzione standard di adenina (da 0,25 a 1,4 cm³ di una soluzione contenente 1 mcg di adenina per cm³); ad un'altra serie di provette con la stessa quantità di terreno si aggiungono quantità corrispondenti del campione. In tutte le provette si introducono inoltre 0,4 cm³ di una soluzione di 8-aza-2,6-diaminopurina (preparata disciogliendo 18 mg di sostanza in 1 litro di acqua) e 0,2 cm³ della sospensione di semina già descritta.

Dopo 48 h di incubazione a 37°C si eseguono le letture turbidimetriche o nefelometriche.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il metodo descritto presenta, rispetto ai metodi chimici, il vantaggio di essere più specifico e meno soggetto ad interferenze.

Rispetto ai metodi microbiologici, che utilizzano *Streptococcus faecalis*, *Thermobacterium acidophilus* e il ceppo mutante di *Escherichia coli*, il procedimento descritto è più specifico, per cui non sono necessari particolari procedimenti di purificazione del campione.

Il metodo possiede una buona sensibilità, poichè in terreno liquido si possono rivelare 0,1 mcg di basi puriniche e quindi circa 0,5 mcg di DNA. Inoltre è relativamente semplice, valendosi di un terreno sintetico di facilissima preparazione e non necessitando di complessi procedimenti per l'estrazione del campione; per la titolazione in terreno solido non è necessario che i campioni siano sterili; non occorrono particolari attrezzature.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) HOFF-JORGENSEN E. - Biochem. J., 50: 400 (1951).
- (²) MILLER H. K. - Virology, 2: 312 (1956).
- (³) SCHNEIDER W. C. - J. biol. Chem., 216: 287 (1955).
- (⁴) ELSON D. e CHARGAFF E. - Experientia, 8: 143 (1952).
- (⁵) ZAMENHOF S. e GRIBOFF G. - Nature, 174: 307 (1954).
- (⁶) HOLMES W. e WELCH A. D. - Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 86: 564 (1954).
- (⁷) MERRIFIELD R. B. e DUNN M. S. - J. biol. Chem., 186: 331 (1950).
- (⁸) MORPURGO G. e CANCELLIERI M. F. - in corso di stampa.
- (⁹) PRINCIVALLE M. e CANCELLIERI M. F. - Rend. Ist. sup. Sanità, 25: 143 (1962).