

# Izolarea și clonarea genelor *ndh* de pe megaplasmidul *pAO1* din *Arthrobacter nicotinovorans*



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

[www.uaic.ro](http://www.uaic.ro)

Andrei Andreea

Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Coordonator științific: Șef lucr. Dr. Marius Mihășan

e-mail: [andrei.c.andreea@gmail.com](mailto:andrei.c.andreea@gmail.com)

# Cuprins

1. Caracterizarea speciei *Arthrobacter nicotinovorans*;
2. Nicotin-dehidrogenaza (NDH) - structură și funcție;
3. Materiale și metode;
4. Rezultate și discuții.

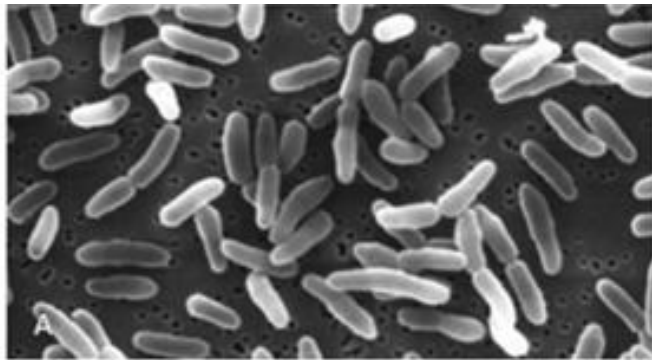
# *Arthrobacter nicotinovorans* și pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

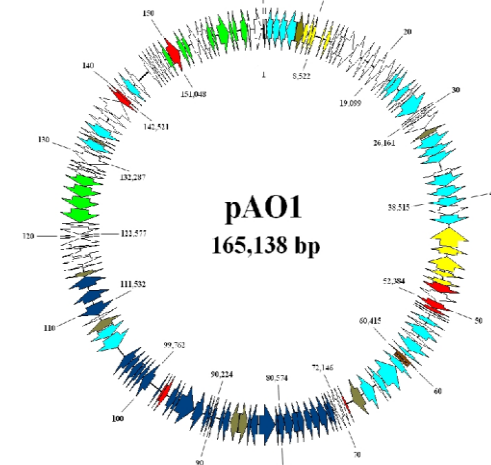
www.uaic.ro

Celula gazdă *A. nicotinovorans*



M. R. Keddie, M. D. Collins, D. J. (1942).  
Genus Arthrobacter. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition*.

Megaplasmidul pAO1



Igloi, G. L., & Brandsch, R. (2003).  
*Journal of Bacteriology*, 185(6), 1976-86

Capacitatea de a degrada nicotina

# Ce urmează?

- Degradarea nicotinei ➡ metaboliți

## Ex: 6-hidroxicotina (6HNic):

❖ Produsă în urma acțiunii enzimei trimere NDH;



❖ Efecte asupra SNC similare, dar mai puternice decât ale nicotinei.

- M. Mihășan et al., *In-silico* identification of 6-hydroxy-L-nicotine as a novel neuroprotective drug, Rom. Biotechnol. Lett., Vol. 18, No. 3, Pag. 8333-8340;
- Hritcu et al. 2013, 6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats, J Physiol Biochem (2013) 69:25-34

# **Materiale și metode**

- 1. Tulpini utilizate:** *A. nicotinovorans pAO1+*, *Escherichia coli* XL1 Blue (Stratagene);
- 2. Amplificarea ADN-ului prin metoda PCR;**
- 3. Separarea electroforetică a fragmentelor de ADN în gel de agaroză (0,75%, în tampon TAE);**
- 4. Metoda miniprep de izolare și purificare a ADN-ului plasmidial:** *ZR Plasmid Miniprep-Classical*;
- 5. Izolarea ADN-ului din gelul de agaroză:** *Zymo Clean Gel DNA Recovery Kit*;
- 6. Clivarea ADN-ului cu enzime de restricție:** BamHI, XbaI, BclI, ApaI;
- 7. Ligarea și transformarea:** Fast Link DNA Ligation Kit, tratament chimic CaCl<sub>2</sub>;
- 8. Clonare direcționată.**

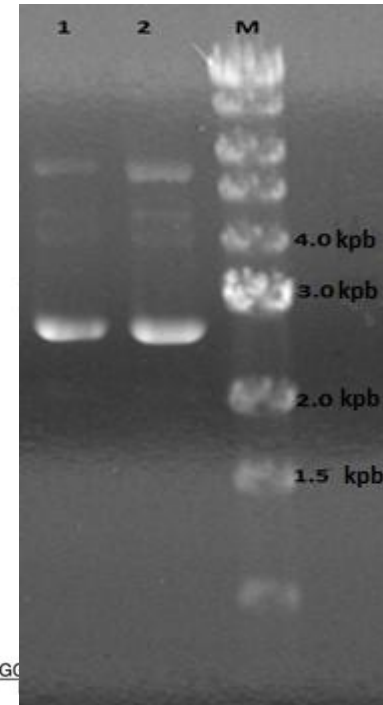
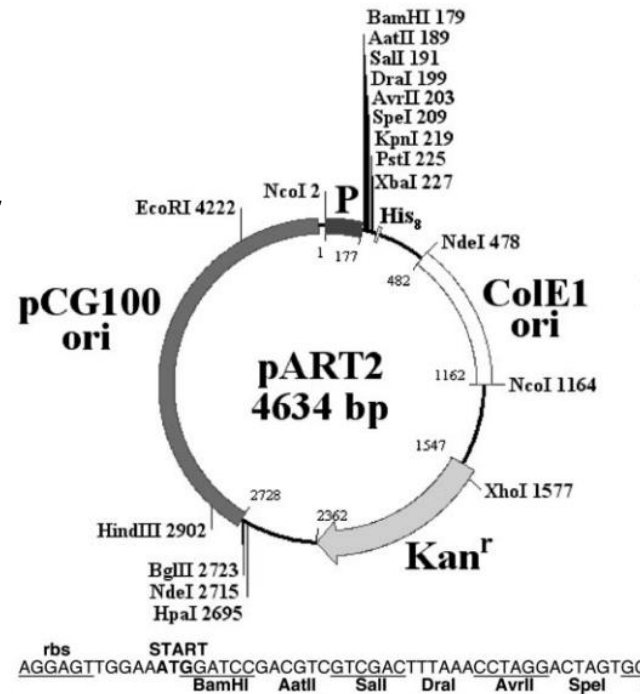
# Rezultate și discuții

## Clonare direcționată

## Vectorul de clonare pART2

8922 SANDU ET AL.

1. Stabilirea secvenței primerilor și sinteza lor;
2. Izolarea genei prin PCR, utilizând drept matriță celule de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1;
3. Digestia fragmentului și vectorului cu enzimele de restricție alese;
4. Ligarea fragmentului în vector;
5. Transformarea celulelor competente de *E. coli*;
6. Selectarea coloniilor recombinante și verificarea clonării prin digestia cu enzime de restricție.



Sandu, C., Chiribau, C.-B., Sachelaru, P., & Brandsch, R. (2005). *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8920-4.



# 1. Amplificarea *in vitro* a acizilor nucleici

Oligonucleotidele amorsă folosite:

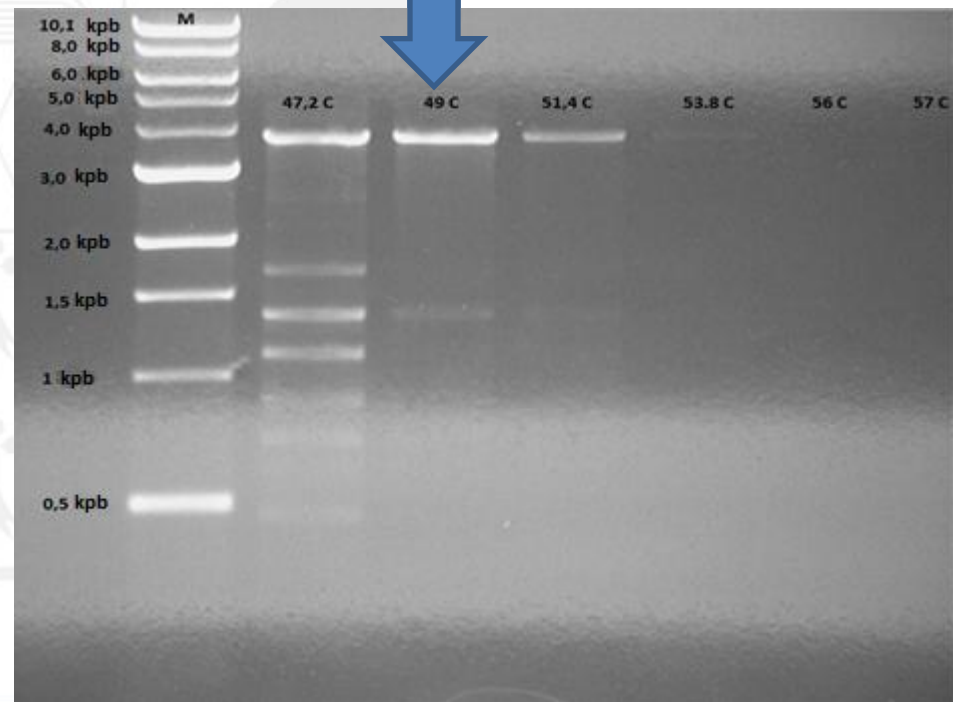
- *ForNDHmbcl* 5'AGTGAAGGATTTGATCAACCTGCTATC'3;
- *RevNDHlxba* 5'CTCCCTGTCTCTAGAGCCCGCGATC'3

Program PCR optim:

- a. Pornirea la cald, 95°C, 5 minute;
- b. Denaturarea, 95°C, 1 minut;
- c. Hibridare complementară, 49°C, 45 s;
- d. Sinteza, 72°C, timp de 4 minute.

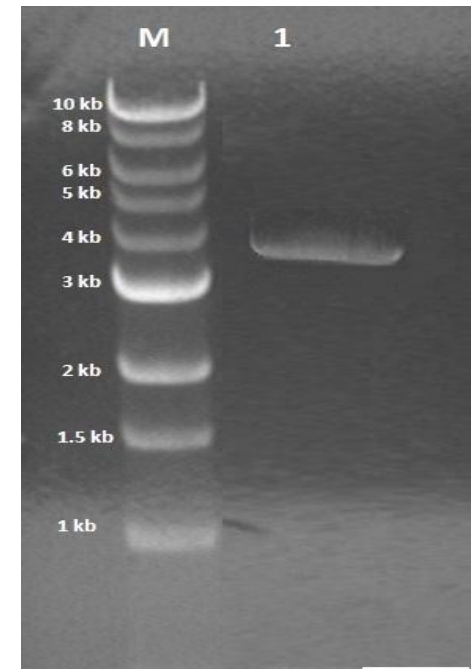
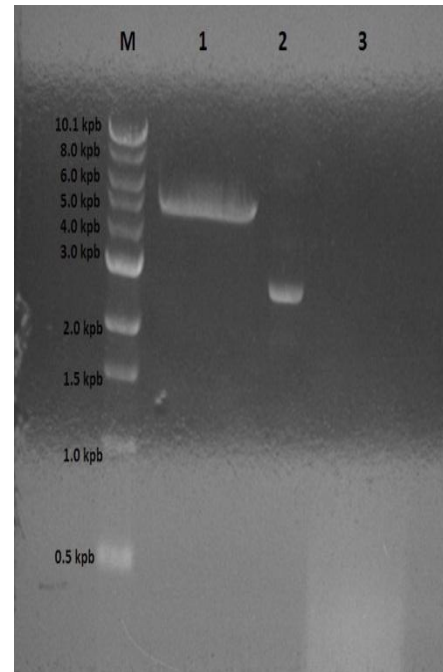
Ultimele trei etape au fost repetate de treizeci de ori, după care s-a efectuat faza de terminare la 72°C, pentru 10 min.

Temperatura optimă de amplificare



## 2. Digestia fragmentului și a vectorului cu enzimele de restricție alese:

- Fragmentul → Enzime:
  - ✓ XbaI, 37° C, NEB 2
  - ✓ BclI, 50° C, NEB 2
- Vectorul → Enzime:
  - ✓ XbaI, 37° C, NEB 2
  - ✓ BamHI, 37° C, NEB 2



Migrarea prin electroforeză a vectorului *pART2* liniar (1), *pART2* circular (2), fragmentului *ndhLSM*

## 3. Izolarea ADN-ului din gelul de agaroză:

- Separare din gel cu Zymo clean Gel DNA Recovery Kit



# 4. Reacția de ligare și transformare a celulelor de *E. coli*

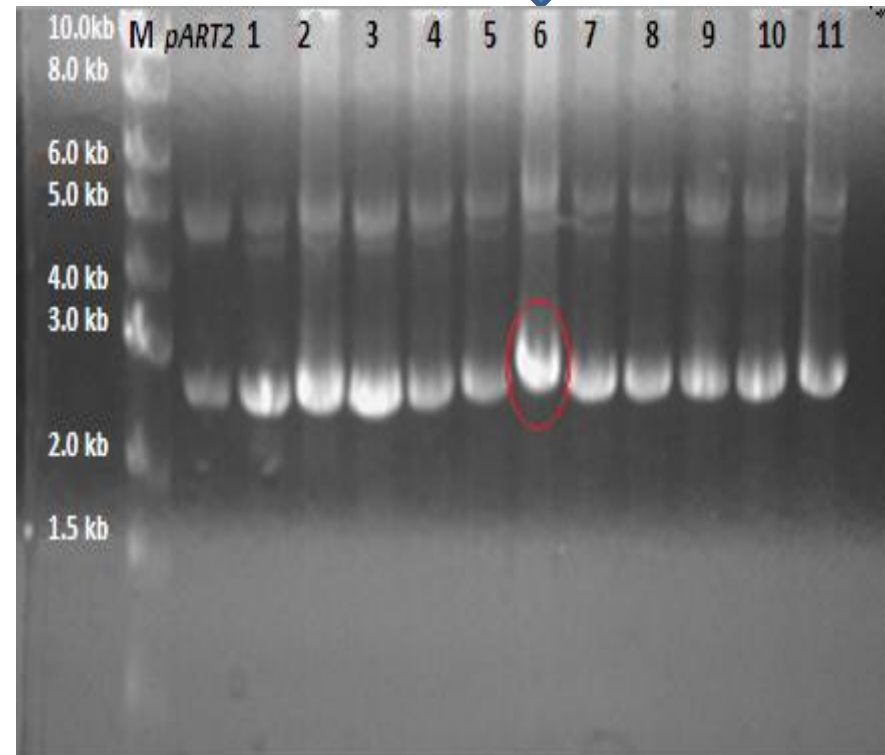
## Materiale

- Vector liniarizat și fragment digerat;
- Fast link DNA ligation kit;
- Celule competente;

Ligare la temperatura camerei, 30 minute.

Selecție pe bază de canamicină, la 37° C, 24 h.

Plasmid recombinat



## 5. Verificarea corectitudinii clonării

- Enzime de tăiere: XbaI (37° C) și ApaI (37° C);

Colonie pozitivă cu fragmentul *ndhLSM*



# Concluzii

- Cele trei gene ce codifică NDH au fost izolate de pe megaplasmidul pA01 și clonate cu succes în vectorul de expresie pART2.
- Vectorul recombinat pART2*ndh*LSM urmează a fi utilizat pentru expresia și purificarea enzimei NDH.



# Rezultatele obținute au permis:

- Publicarea unui articol - Andrei Andreea, Marius Mihășan, 2013, Molecular gene cloning of nicotine-dehydrogenase from the *pAO1* megaplasmid of *Arthrobacter nicotinovorans*, Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași Sec. II a. Genetică și Biologie Moleculară, Vol. 14, Nr. 3, Pag. 15-19;
- Participarea la două conferințe:
  1. Simpozionul Național „Tineri Cercetători în Științe Biologice” Ediția I, Cluj-Napoca, 2013;
  2. Sesiunea științifică a Studenților, Iași, 2013.

