

IZOLAREA ȘI CLONAREA GENEI *PPL* DE PE MEGAPLASMIDUL pAO1



Lucrare de Licență

Absolvent,
Constantin Oana Maria

Coordonator științific,
Șef Lucrări Dr. Mihășan Marius

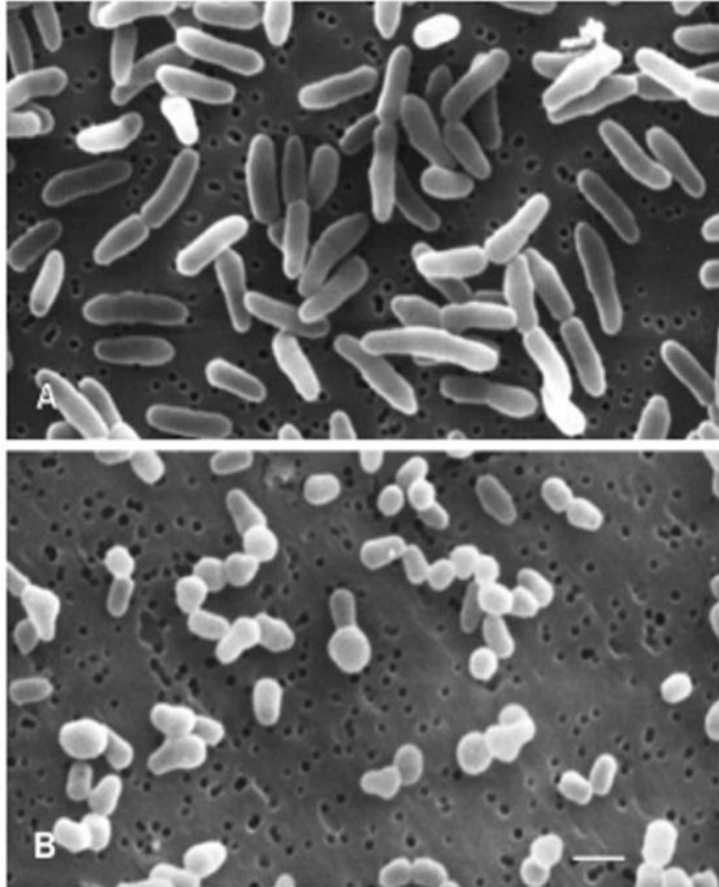
Sesiunea Iulie 2014

Cuprins

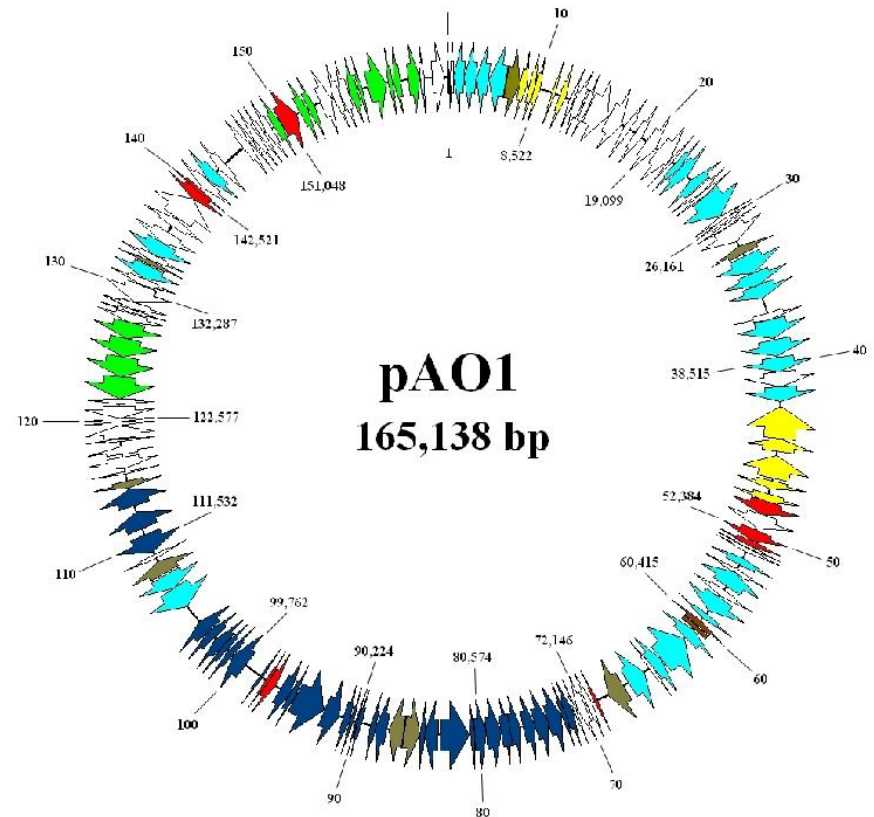


- **Capitolul I** - Caracterizarea megaplasmidului pAO1 din *Arthrobacter nicotinovorans*
- **Capitolul II** - Organizarea genică a megaplasmidului pAO1
- **Capitolul III** - Mecanismul metabolic al degradării carbohidraților în *Arthrobacter nicotinovorans pAO1+*
- **Capitolul IV** - Metode de cercetare
- **Capitolul V** - Rezultate și discuții
- **Concluzii**

Arthrobacter nicotinovorans și megaplasmidul pAO1

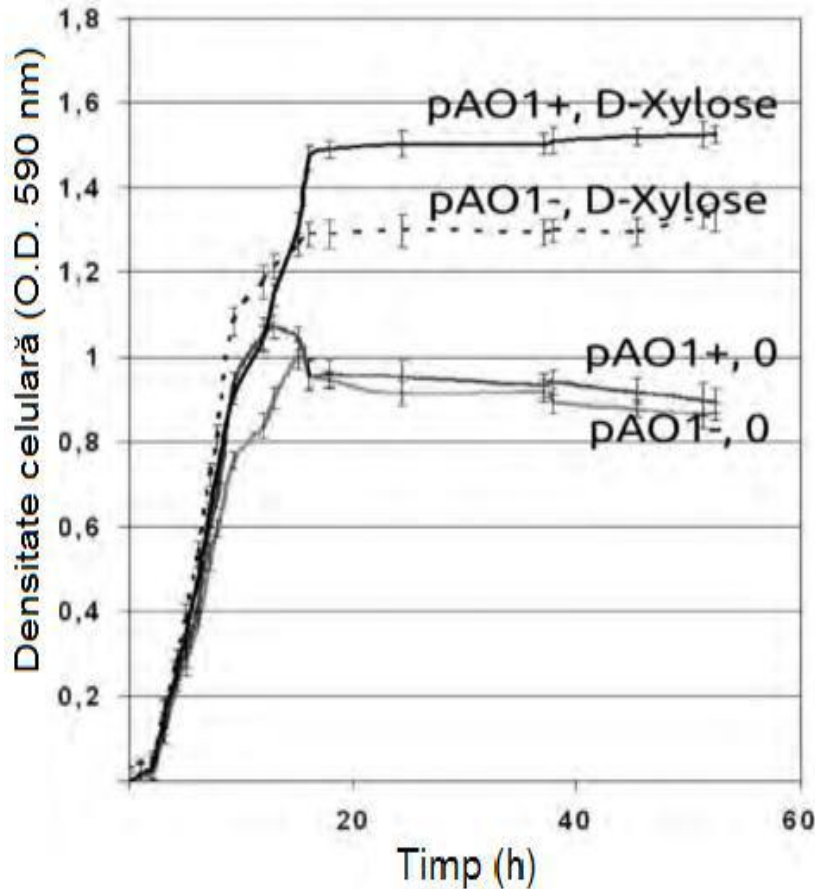


Arthrobacter nicotinovorans - microscop electronic. A. celule cu formă bacilară; B. celule cu formă cocoidă.

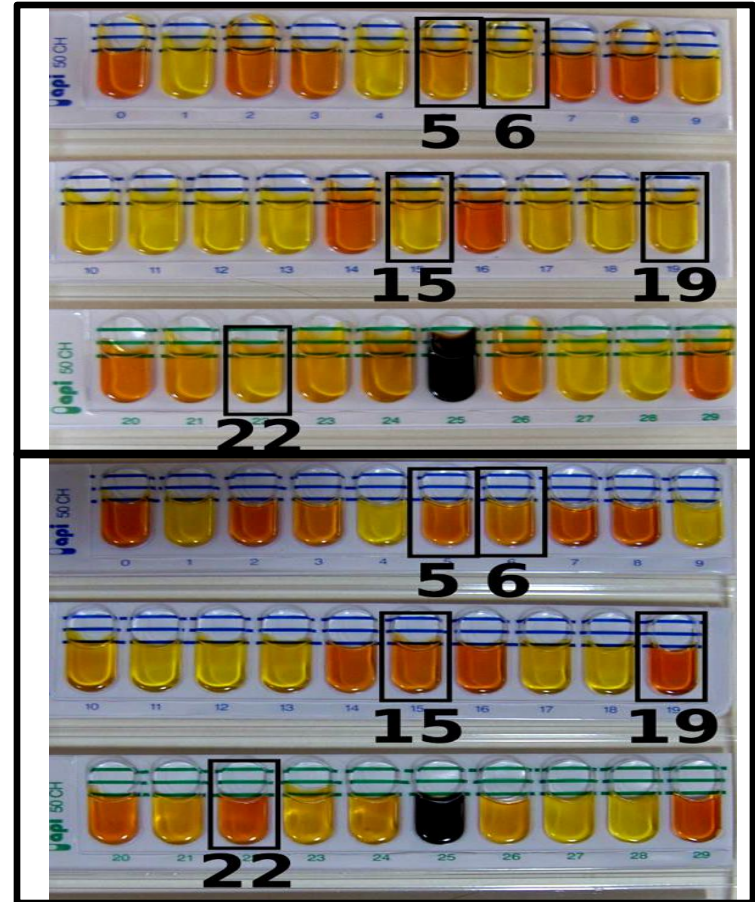


Harta genetică a megaplasmidului pAO1. (Mihășan, 2011)

Arthrobacter nicotinovorans și megaplasmidul pAO1



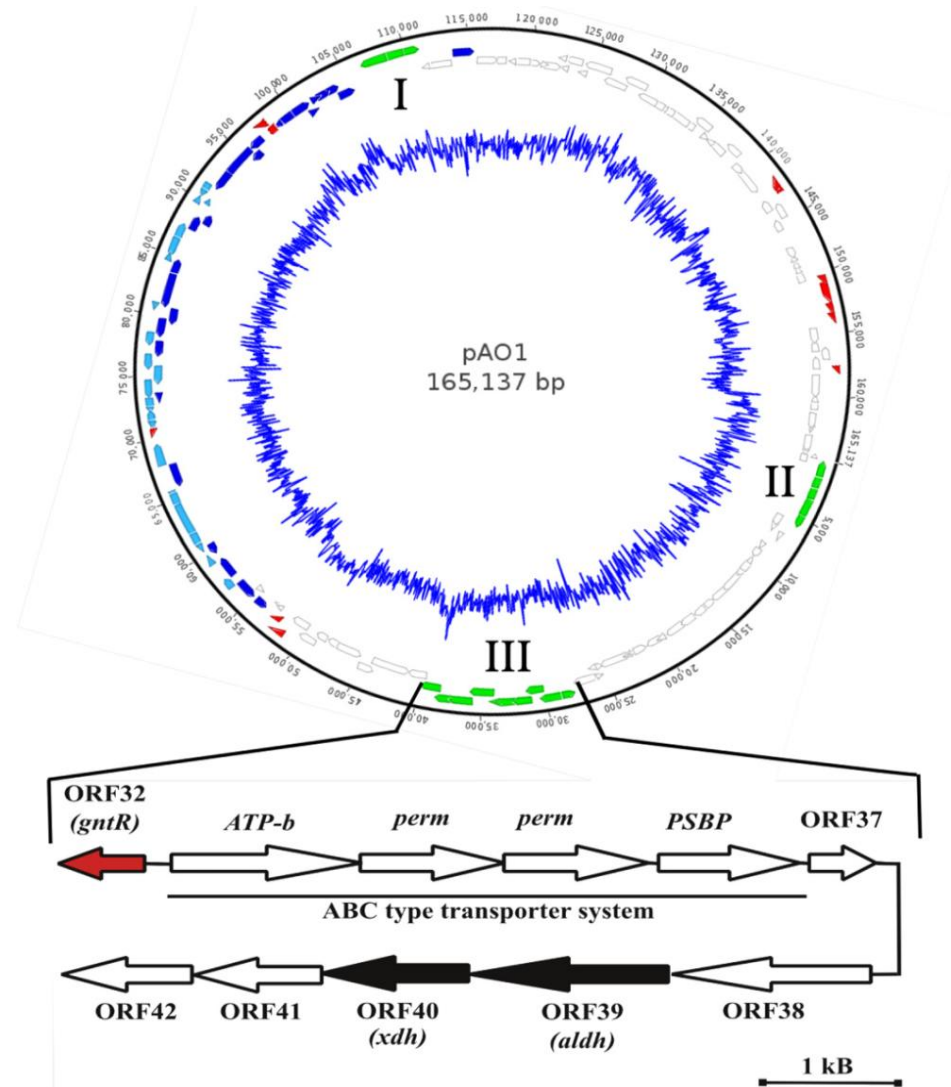
Curbele de dezvoltare ale unei tulpini *A. nicotinovorans* pAO1+ și ale unei tulpini pAO1-, crescute pe mediu cu și fără xiloză. (Mihășan, 2012)



Modificarea culorii indicatorului evidențiază degradarea carbohidraților; A. *A. nicotinovorans* pAO1- B. *A. nicotinovorans* pAO1+. (Mihășan, 2011)

ORF32 - ORF42 : grup de gene *ch* ce codifică elemente esențiale ale unei căi de metabolizare a xilozei.

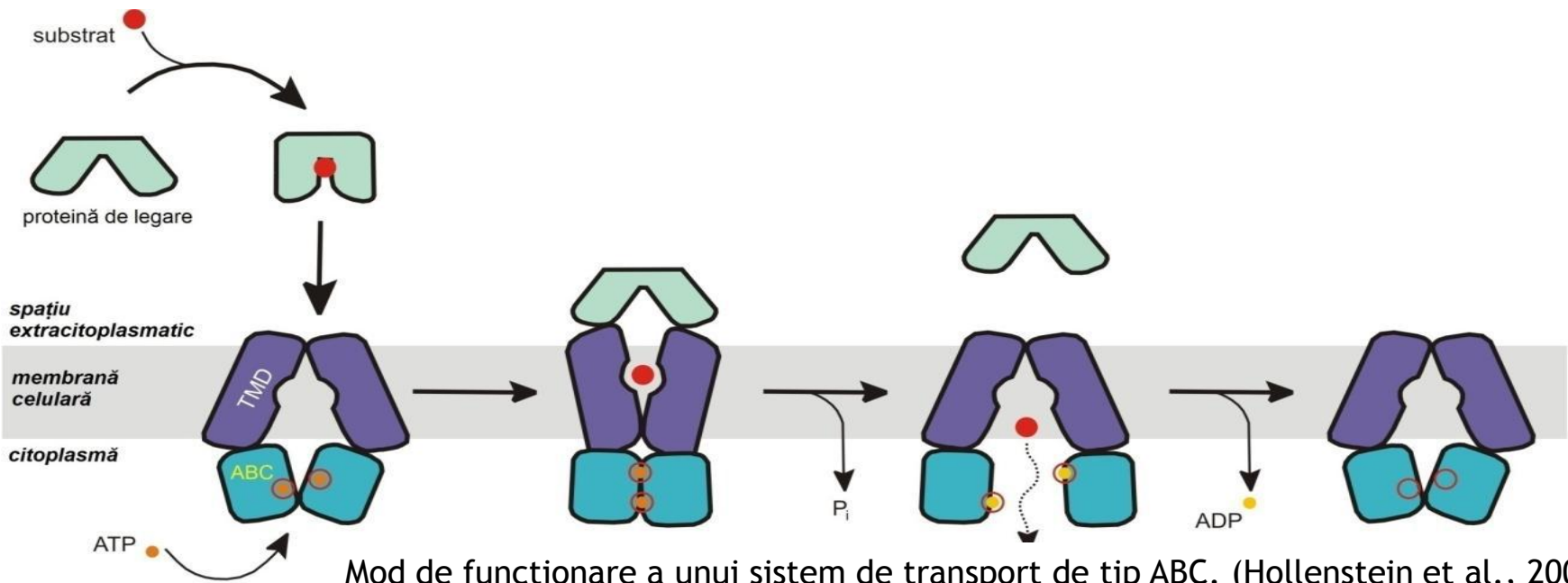
Datorită acestui mecanism xiloza este introdusă în celulă printr-un sistem de transport de tip ABC și apoi metabolizată oxidativ prin intermediul enzimelor specifice codificate de aceste gen, întreg procesul fiind dirijat de un factor de reglaj al transcripției.



Organizarea genică a megaplasmidul pAO1. III - grup de gene relaționat cu metabolizarea xilozei. (Mihășan, 2013)

Gene responsabile de codificarea unui sistem de transport de tip ABC.

- *orf 33* ar codifica pentru o proteină de tip ATP-ază, asigurând sursa de energie necesară transportului anti-gradient;
- *orf 34* și *orf 35* sunt responsabile de proteinele integrale care formează porul transmembrantar;
- *orf 36* (gena *ppl*) codifică o presupusă proteină periplasmatică ce ar avea rol în identificarea și legarea substratului D-xiloză.



Mod de funcționare a unui sistem de transport de tip ABC. (Hollenstein et al., 2007)



Materiale și metode



Tulpini utilizate și condiții de creștere: *Escherichia coli* XL1 Blue pH6EX3 cultivată pe mediu LB lichid și incubată la 37° C/190 rpm; *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ cultivat în mediu citrat și incubat la 28° C/190 rpm; în cazul utilizării antibioticului ampicilină în mediul de cultură concentrația acestuia este de 50 µg/ml.

Amplificarea ADN. Gena *ppl* a fost izolată prin PCR utilizând ca matriță o suspensie celulară de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ și următorii primeri:

Forward: 5'gcg gta cta GGA TCC gcc gcc atg'3

Reverse: 5'cgg gtc att cTc GaG cgc aca ggg'3

Extracțiile plasmidiale au fost efectuate folosind metoda miniprep utilizând trusa de extracție ZR Plasmid Miniprep™ - Classic.

Izolarea și purificarea din gelurile de agaroză a materialului genetic au fost realizate folosind trusa de izolare Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit.

Clivarea ADN-ului cu enzime de restricție a fost efectuată folosind enzimele BamHI, XhoI și PstI (New-England Biolabs).

Ligarea fragmentului și a vectorului a fost realizată folosind kitul Fast-Link™ DNA Ligation.

Celulele competente au fost obținute folosind celule de *E.coli* XL1 Blue și metoda standard cu clorură de Ca²⁺.

Celulele recombinante au fost selectate prin cultivare pe plăci cu mediu LB suplimentat cu ampicilină 50 µg/ml.

Geluri de agaroză folosite pentru migrarea acizilor nucleici prin electroforeză au fost de concentrație 1.5% sau 0.75%, realizate în tampon TAE 1x. Pentru vizualizare s-au utilizat bromura de etidiu și sistemul Biorad Gel-Doc.

Clonarea genei *ppl* din pA01

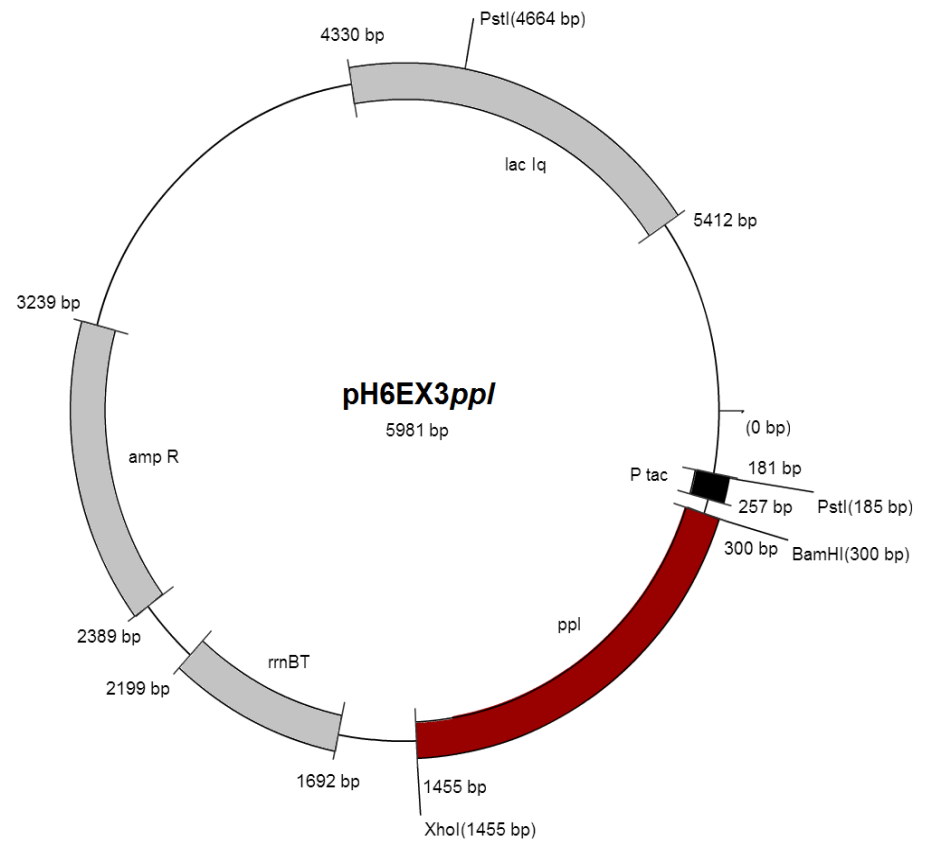


Strategie generală de clonare urmărită:

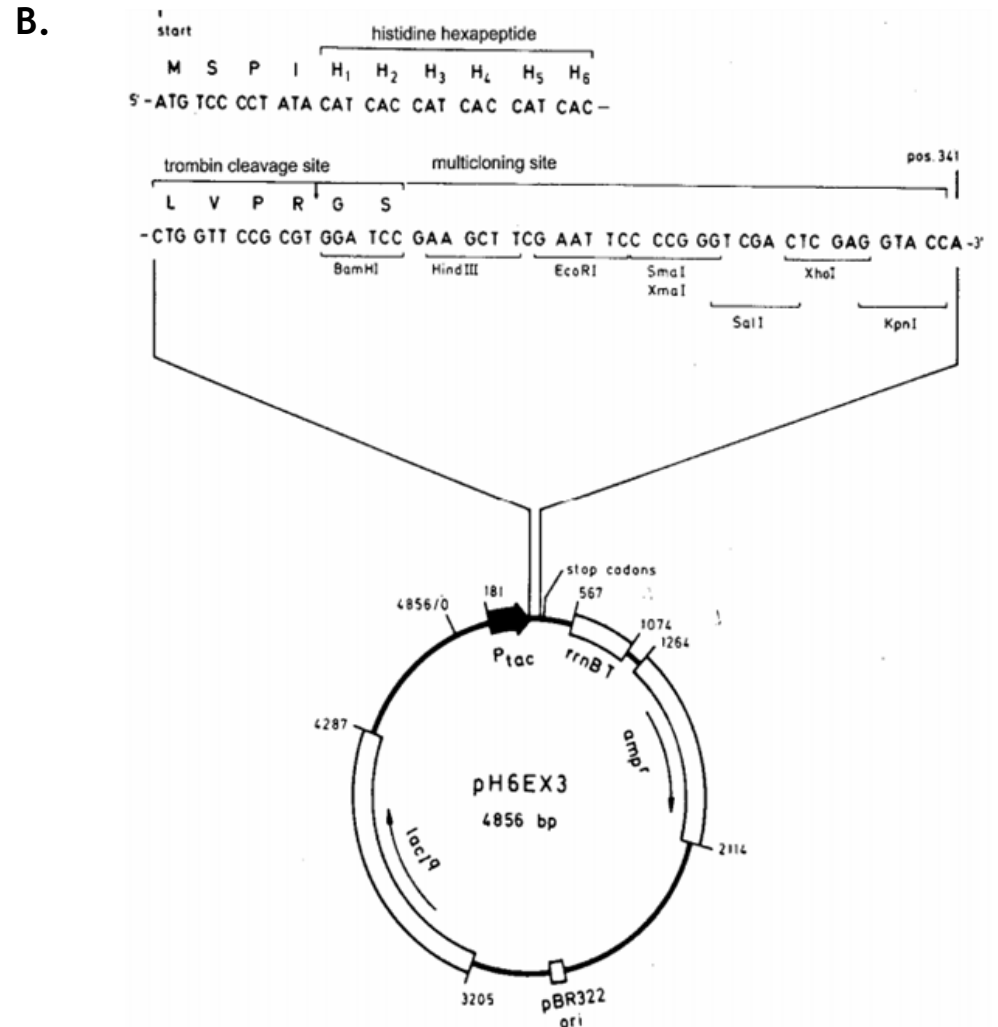
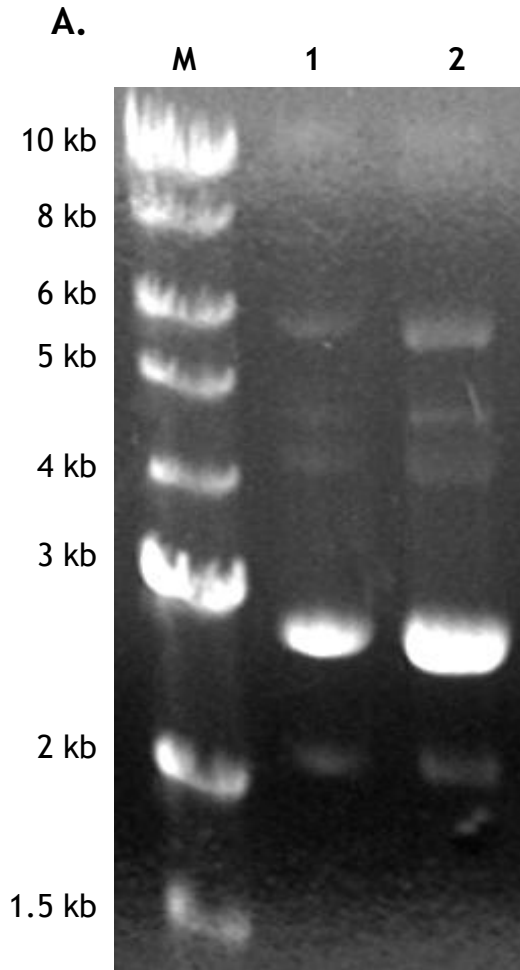
- stabilirea unui vector de clonare (pH6EX3, 4856 bp) și izolarea acestuia;
- alegerea primerilor corespunzători și sinteza lor;
- izolarea genei prin PCR, utilizând drept matriță celule de *Arthrobacter nicotinovorans* pA01+;
- digestia fragmentului și vectorului cu enzimele de restricție alese;
- ligarea fragmentului în vector;
- transformarea celulelor de *E. coli*;
- selectarea coloniilor recombinante.



Rezultate și discuții



1. Alegerea unui vector de clonare și izolarea acestuia



Vectorul plasmidial pH6EX3. A. După izolarea din *E. coli* XL1 blue. B. Harta genică.

2. Alegerea primerilor și amplificarea genei prin PCR

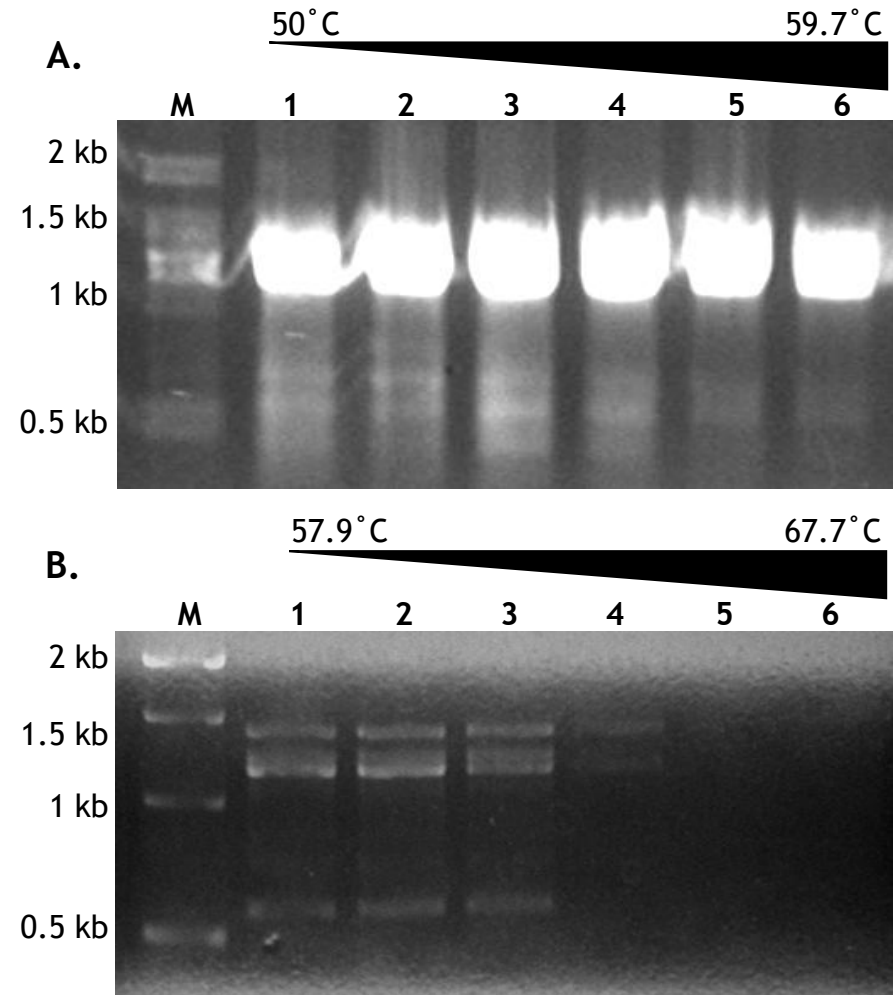


Primerii utilizați:

Forward: 5'gcg gta cta GGA TCC gcc gcc atg'3

Reverse: 5'cgg gtc att cTc GaG cgc aca ggg'3

Aceștia ajută nu doar în izolarea genei (1181 bp) și amplificarea ei, dar asigură și inserția unor situs-uri de restricție la capetele genei. Acest lucru se datorează faptului că nu corespund 100% cu secvența de pe catena de ADN, ci sunt degenerați în anumite puncte esențiale.

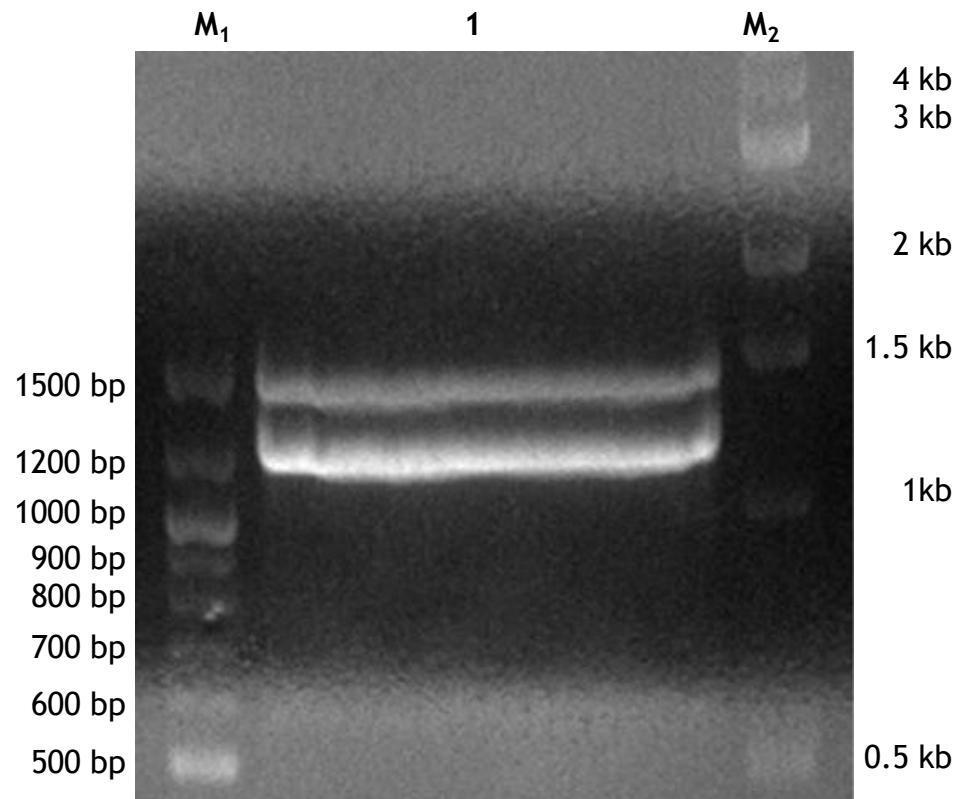


2. Alegerea primerilor și amplificarea genei prin PCR



În urma amplificării la temperatura de legare de 50.2°C, se remarcă apariția a două benzi diferite de separație a materialului genetic între semnele markerilor de 1200 bp și 1500 bp.

Ținând cont că fragmentul ce se dorește izolat are lungimea de **1181 bp** se poate concluziona că banda de dimensiune inferioară este cea de interes.



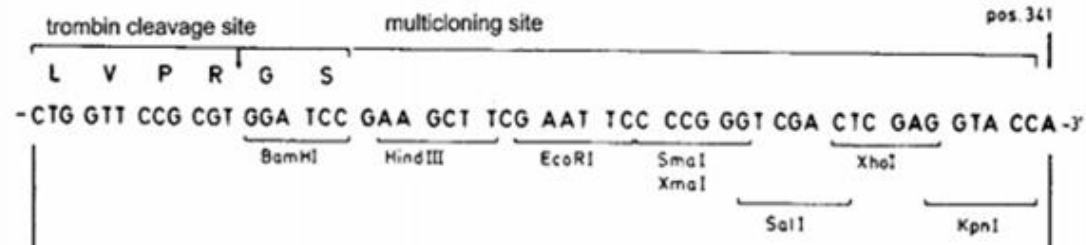
Reacția de amplificare a genei *ppl* prin PCR la temperatura de 50.2 °C.

3. Digestia fragmentului și a vectorului cu enzime de restricție

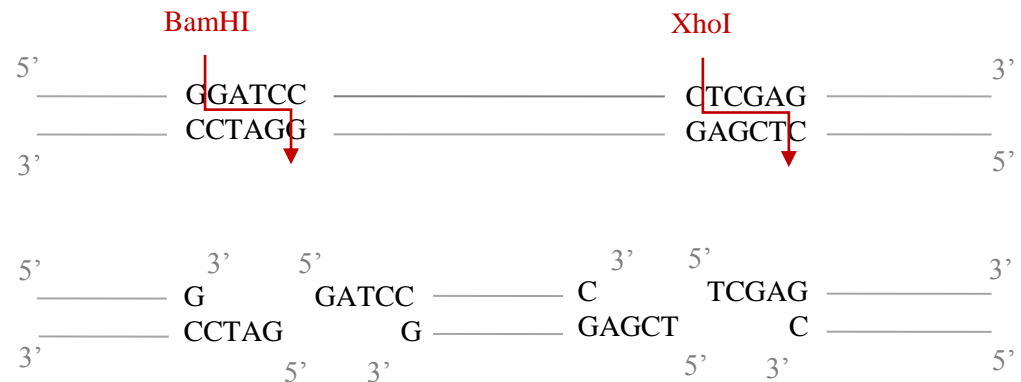


Alipirea fragmentului de interes în cadrul vectorului de expresie pH6EX3 este posibilă în urma unei duble digestii enzimatică a celor două elemente.

S-au folosit ca enzime de restricție BamHI și XhoI, fiecare având situsuri diferite de recunoaștere și clivare, generând capete compatibile complementare diferite, asigurându-se astfel o clonare direcționată.

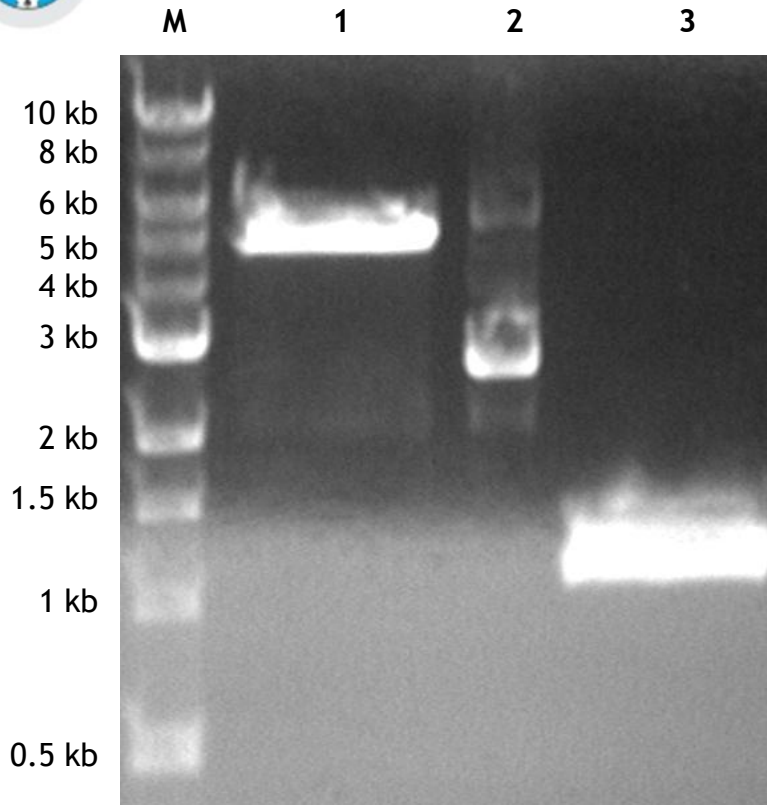


Situsul de clonare multiplu din vectorul pH6EX3.

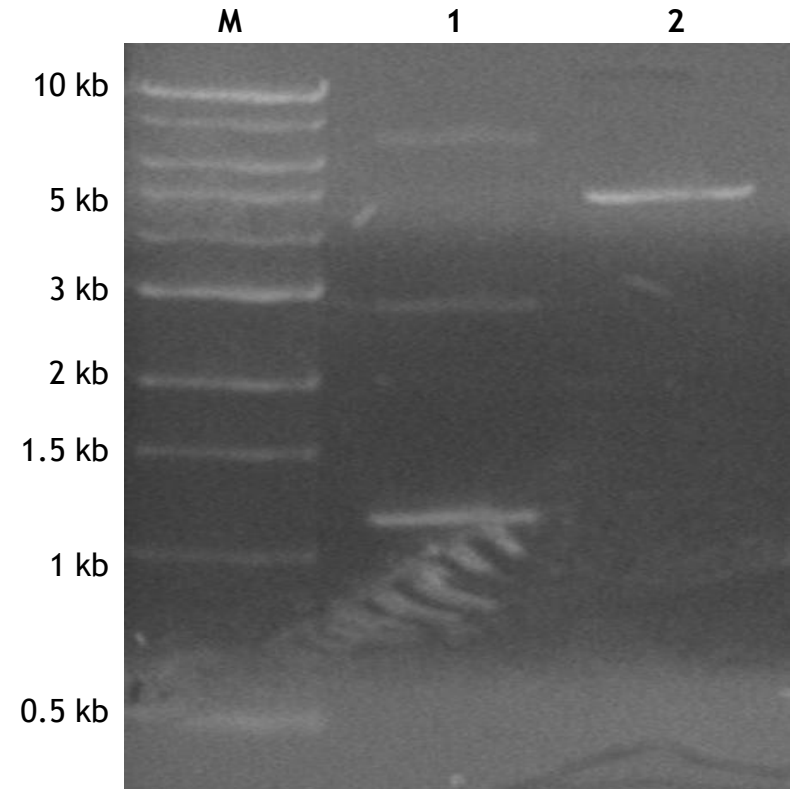


Modul de clivare al enzimelor BamHI și XhoI în cadrul vectorului de clonare și a fragmentului *ppl*.

3. Digestia fragmentului și a vectorului cu enzime de restricție



Electroforeză realizată în urma digestiei cu enzime de restricție. 1. vectorul plasmidial pH6EX3 tăiat. 2. vectorul plasmidial pH6EX3 circular. 3. gena *ppl* tăiată.



Electroforeză de verificare a izolării. 1.gena *ppl* tăiată 2. vectorul plasmidial pH6EX3 tăiat.

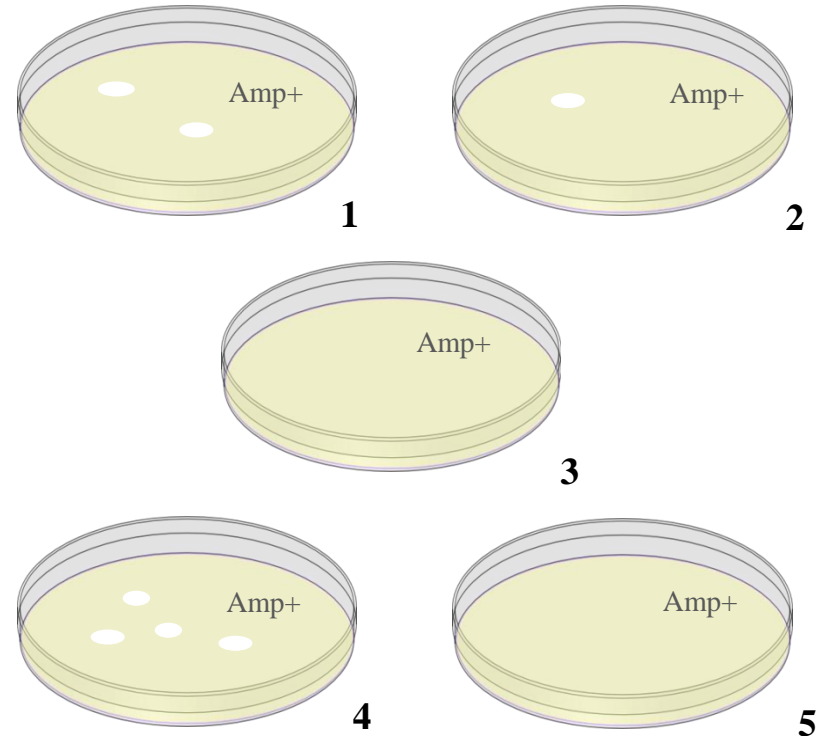
4. Ligarea fragmentelor și transformarea celulelor competente de *E. Coli*



După digestia genei *ppl* și a vectorului pH6EX3 cu enzimele de restricție BamHI și XhoI, fragmentele rezultate vor avea capete coezive complementare.

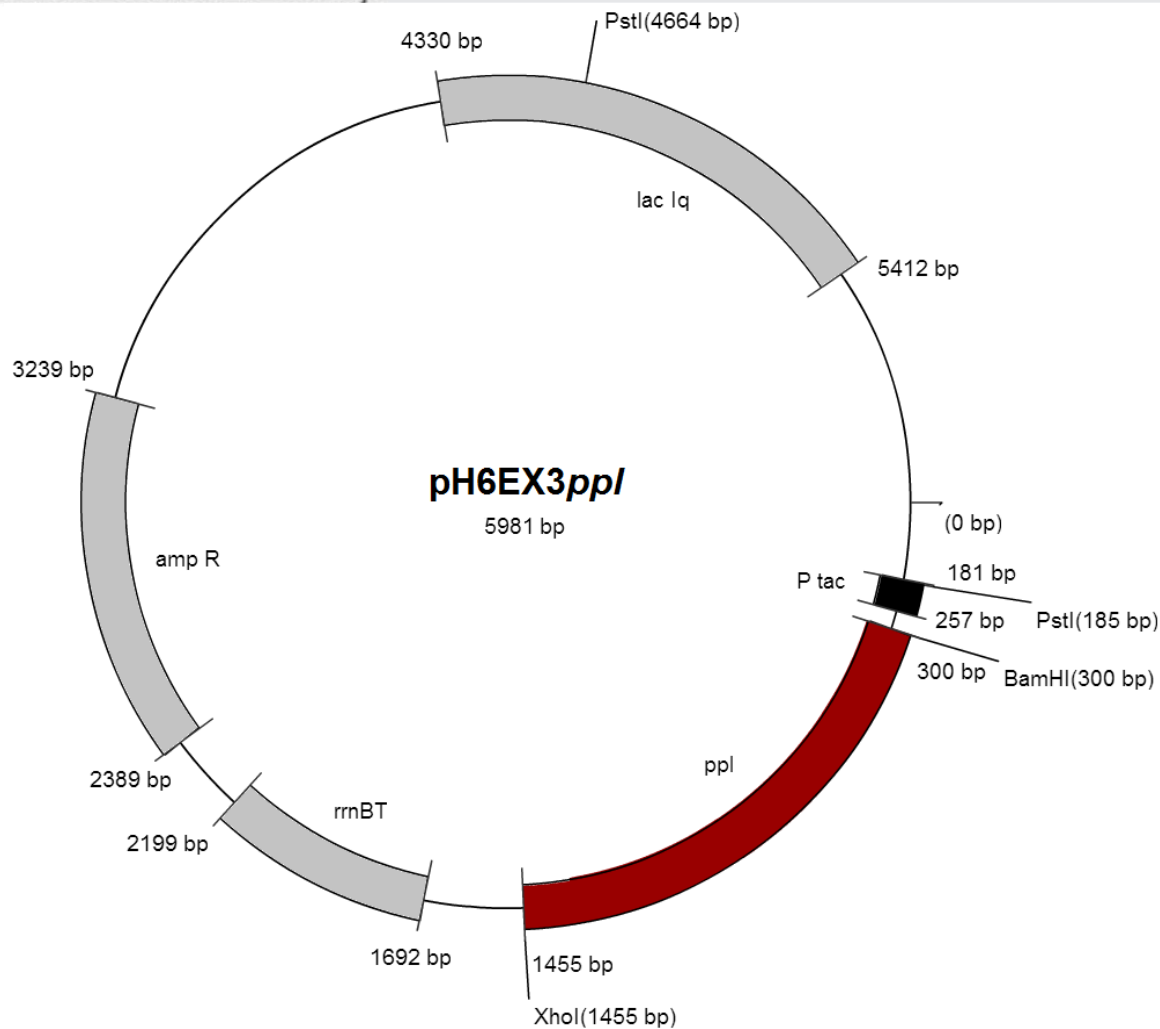
Astfel, cele două fragmente de ADN vor fi supuse unei ligări enzimatică, fragmentul genei *ppl* fiind inserat în plasmid în mod direcționat.

După realizarea ligării, amestecurile de reacție au fost folosite pentru transformarea celulelor de *E. coli* competente.



Colonii crescute pe mediu cu ampicilină 1- 2. celule de *E. coli* transformate cu vectorul recombinat; 3. celule de *E. coli* transformate doar cu vectorul pH6EX3 liniar; 4. celule de *E. coli* transformate cu vectorul pH6EX3 circular; 5. celule competente.

Verificarea corectitudinii clonării



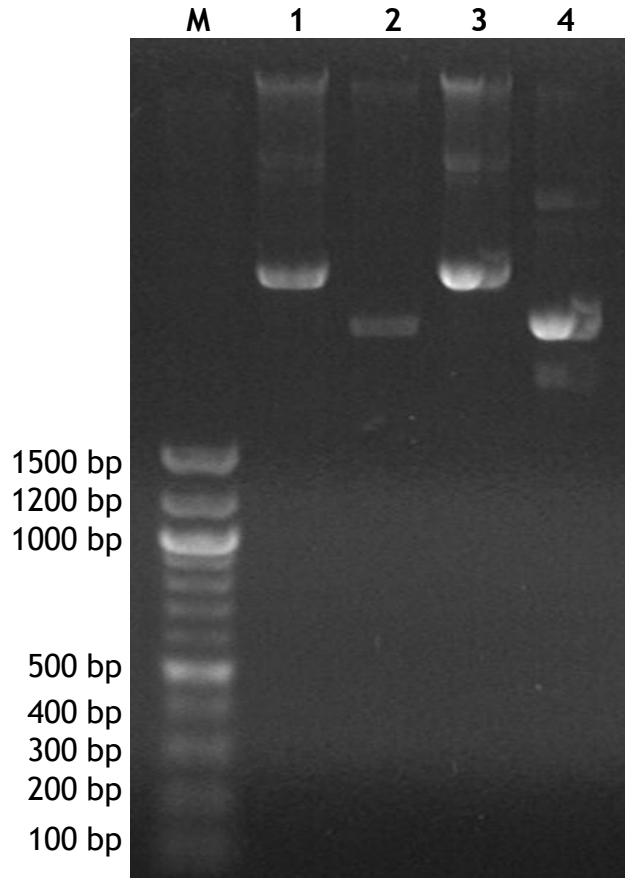
Harta genică a vectorului recombinat pH6EX3ppl.

Extracția plasmidului recombinat

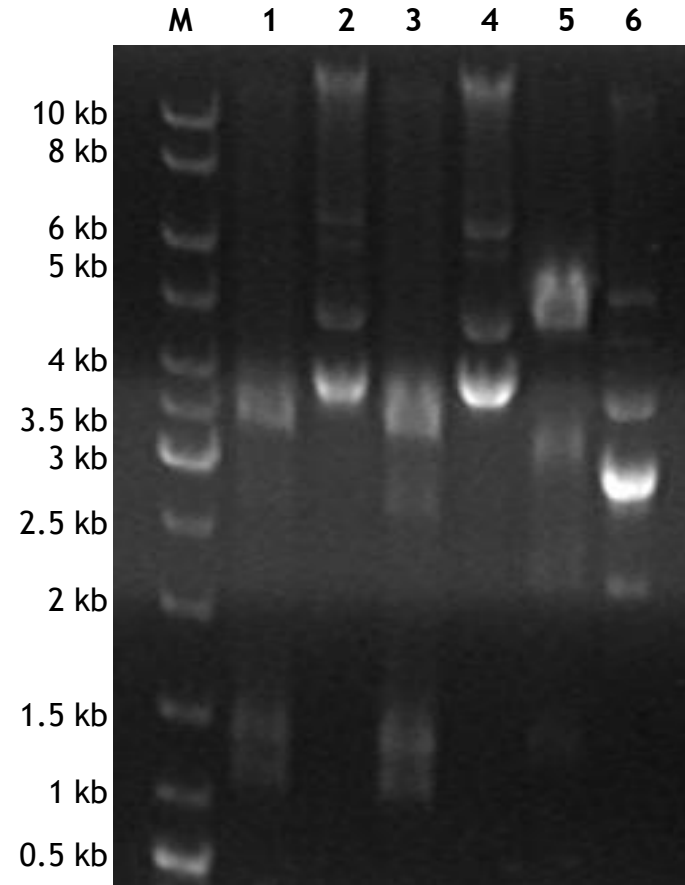
Digestie enzimatică a pH6EX3ppl



A.



B.



Verificare a corectitudinii clonării. A. Electroforeză a ADN-ului plasmidial B. Electroforeză a produșilor rezultați în urma digestiei cu XhoI și PstI.

Concluzii



- Gena *ppl* a fost amplificată prin PCR folosind un program specific în care etapa de legare a primerilor a fost realizată la 50.2° C
- Fragmentul ce conține gena *ppl* a fost introdus cu succes în cadrul vectorului de clonare pH6EX3
- S-a obținut o tulpină de *Escherichia coli* ce conține vectorul recombinat pH6EX3*ppl*

Concluzii



Rezultatele acestui studiu au fost folosite pentru a fi publicate în cadrul unui articol științific și prezentate la Sesiunea științifică anuală a Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” Iași din 2013.

Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XV, 2014

GENE CLONING OF A PUTATIVE PERIPLASMIC SUGAR-BINDING PROTEIN FROM THE pAO1 MEGAPLASMID OF *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*

OANA CONSTANTIN¹, MARIUS MIHĂȘAN^{1*}

Keywords: *Arthrobacter*, catabolic megaplasmid, xylose, ABC-type transport system

Abstract: D-xylose is a very important fraction of lignocellulose and it provides a promising renewable resource for production of bio-ethanol or other various chemicals. Recently, the pAO1 megaplasmid of *Arthrobacter nicotinovorans* has been linked with the ability of this microorganism to metabolize D-Xylose through a less common oxidative pathway. The operon encoding the *A. nicotinovorans* oxidative xylose-catabolic pathway has been identified and some enzymes have been isolated and characterized. So far, the mechanisms underlying operon activation and xylose transport have been neglected. The *xyl* operon contains all the components of a ABC-type transport system that must be involved in cross-membrane transport of D-Xylose. In this work, a PCR protocol for the isolation of the putative periplasmic binding protein (ppl) component of the ABC-type system has been established and the DNA fragment containing the *ppl* gene has been cloned into the pH6EX3 expression vector.