

EVALUAREA PREZENȚEI GENELOR RESPONSABILE DE METABOLIZAREA NICOTINEI ÎN TULPINA *ARTHROBACTER SP. AK-YN10*

- Lucrare de Disertație -



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Boiangiu Răzvan Ștefan*

Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași

Coordonator științific: Conf. Dr. Habil. Marius Mihășan

*boiangiu.razvan@yahoo.com

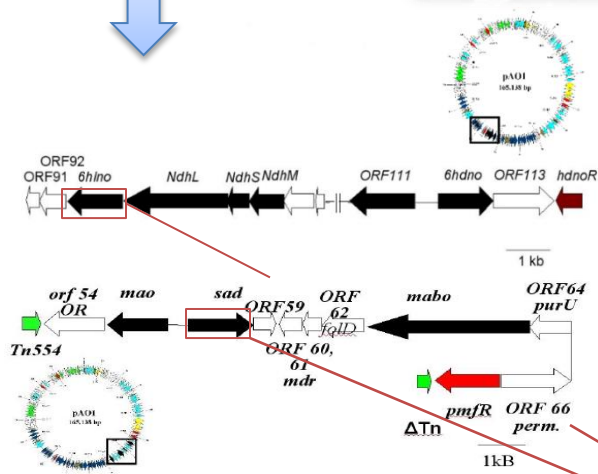
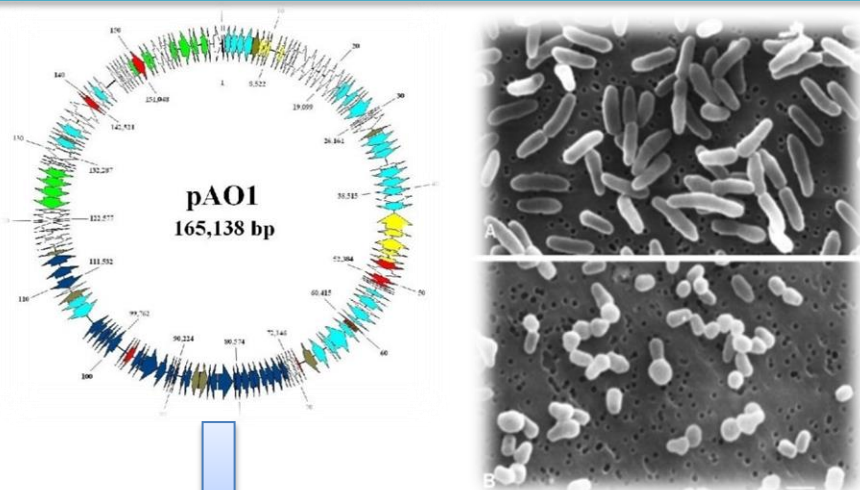
Arthrobacter sp. AK-YN10 și A. nicotinovorans pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Arthrobacter nicotinovorans pAO1



Arthrobacter sp. AK-YN10

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-015-6975-5



ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

s-triazine degrading bacterial isolate *Arthrobacter sp. AK-YN10*, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil

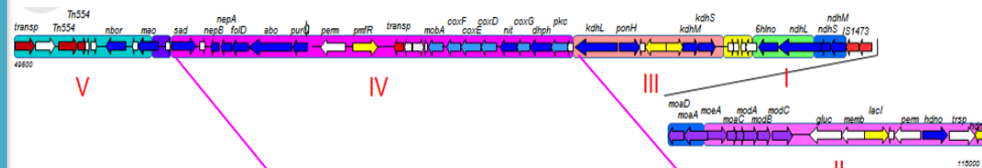
Sneha Sagarkar¹ · Pooja Bhardwaj¹ · Veronika Stork² · Marion Devers-Lamrani² · Fabrice Martin-Laurent² · Atya Kapley¹



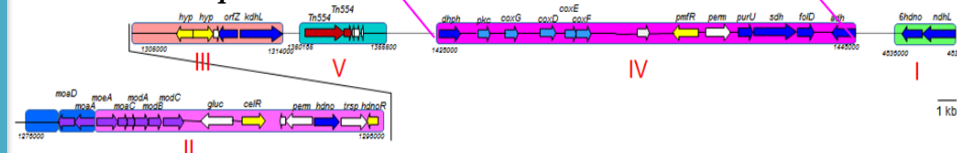
Draft Genome Sequence of Atrazine-Utilizing Bacteria Isolated from Indian Agricultural Soil

Sneha Sagarkar, Pooja Bhardwaj, Trilok C. Yadav, Asifa Qureshi, Anshuman Khardenavis, Hemant J. Purohit, Atya Kapley
Environmental Genomics Division, National Environmental Engineering Research Institute, CSIR-NEERI, Nagpur, India

Arthrobacter nicotinovorans pAO1



Arthrobacter sp. AK-YN10



Sunt aceste gene localizate în AK-YN10?

Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 493–498
DOI 10.1007/s00253-005-0226-0

Prokaryotes (2006) 3:945–960
DOI: 10.1007/s-387-30743-5_36

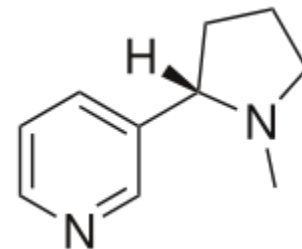
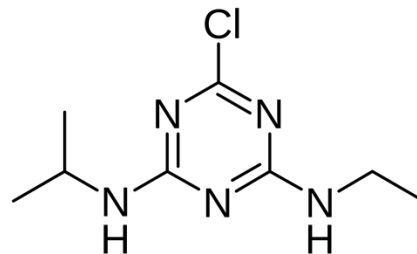
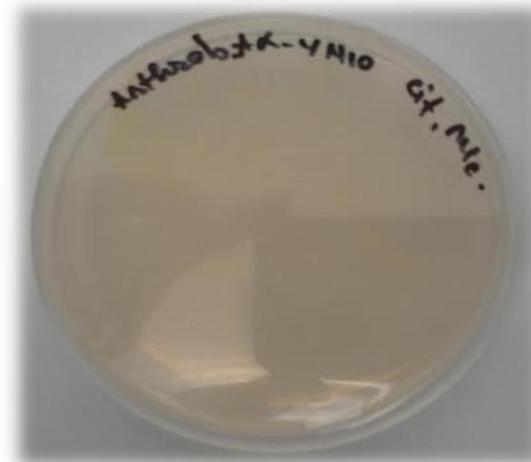
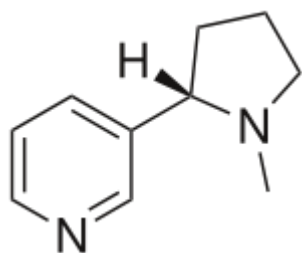
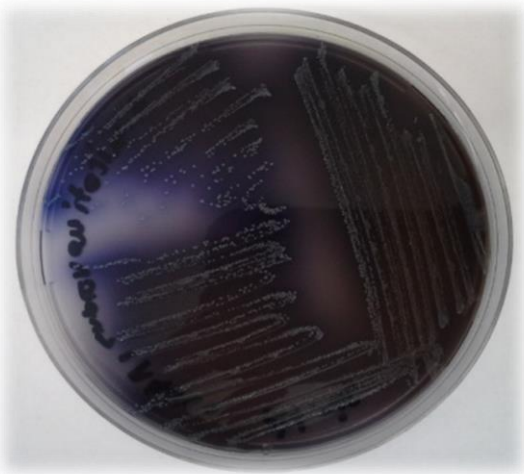
CHAPTER 1.1.21

The Genus *Arthrobacter*

DOROTHY JONES AND RONALD M. KEDDIE

Roderich Brandsch

Microbiology and biochemistry of nicotine degradation





Materiale și Metode

Tulpini utilizate și condiții de creștere:

A. nicotinovorans pAO1 și *Arthrobacter sp.* AK-YN10 (sușă oferită cadou de Dr. Atya Kapley – Institutul Național de Cercetare și Inginerie a Mediului, CSIR-NEERI, Nagpur, India) au fost cultivate în mediul citrat suplimentat cu nicotină 0.05% și 0.05 % soluție de minerale pe un agitator rotativ la 28⁰C/190 rpm.

Examenul bacteriilor în froțiuni colorate:

- Colorație Gram
- Microscop confocal Leica TCS SPE DM 5500Q, cu cameră DFC-290, soft - LAS (Leica Application Suite-versiune 2.8.1.)

Izolarea ADN-ului total:

Protocol bazat pe extracție cu fenol-cloroform și precipitare cu izopropanol

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1983, p. 549–552
0099-2240/83/090549-04\$02.00/0
Copyright © 1983, American Society for Microbiology

Vol. 46, No. 3

Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci†

DOUGLAS G. ANDERSON¹ AND LARRY L. MCKAY^{2*}

Department of Microbiology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55450,¹ and Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108²

Separarea ADN-ului:

- Electroforeză în gel de agaroză (0.75% în TAE 1X, 0.5 μ g/ml EtBr)
- ADN-ul a fost vizualizat utilizând un sistem Biorad Gel-Doc

Purificarea ADN-ului plasmidial:

- Benzile de ADN plasmidial au fost tăiate din gel
- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

Amplificare PCR:

- Termociclor Biometra T-Gradient
- Determinarea T_m , a timpului necesar pentru sinteză și a concentrației de $MgCl_2$
- Genele *bhln0* (1277 pb) și *sad* (1353 pb) au fost amplificate



Program PCR:

	Etapă	Timp	Temperatură
1'	Denaturare inițială	5 minute	95°C
1	Denaturare	1 minut	95°C
2	Legarea primerilor	45 secunde	Variabil
3	Sinteză	Variabil	72°C
Etapetele 1-3 se repetă de 30 de ori			
4	Extensie finală	10 minute	72°C

Primeri utilizați:

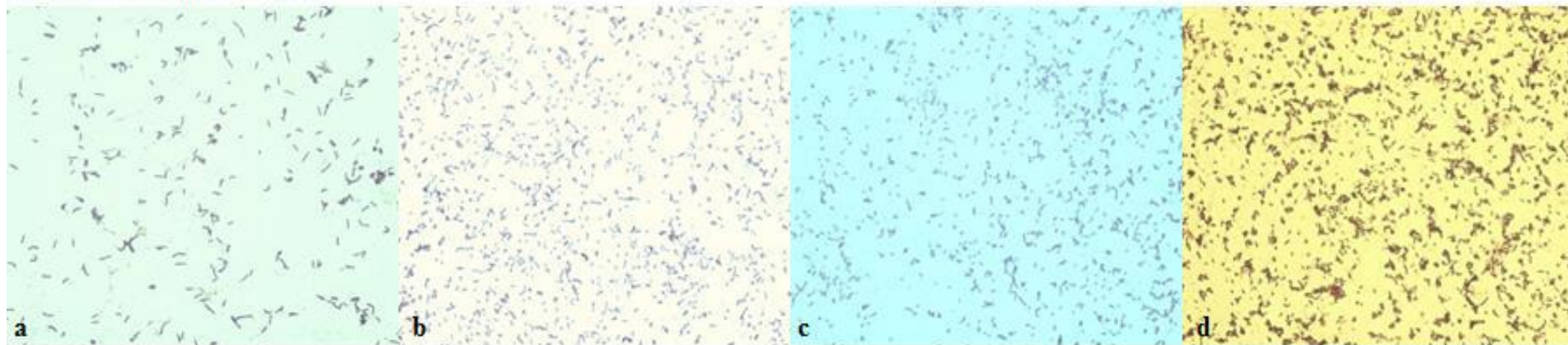
Genă	Primer	Secvență
<i>6hln</i>	HindIII6hlnofw	5' AAG AAG GAA AGC TTT GTA TGA CGC GA 3'
	KpnI6hlnorev	5' GTC TGC AGG TAC CTA CGA ATG CAG 3'
<i>sad</i>	SDHBamHIfor	5' GTG CGT GAT CCG GAT CCG GGG AGG TGC 3'
	SDHXhoIrev	5' CAT GTA AGC CCC CTC GAG TCG TTC AGT TC 3'



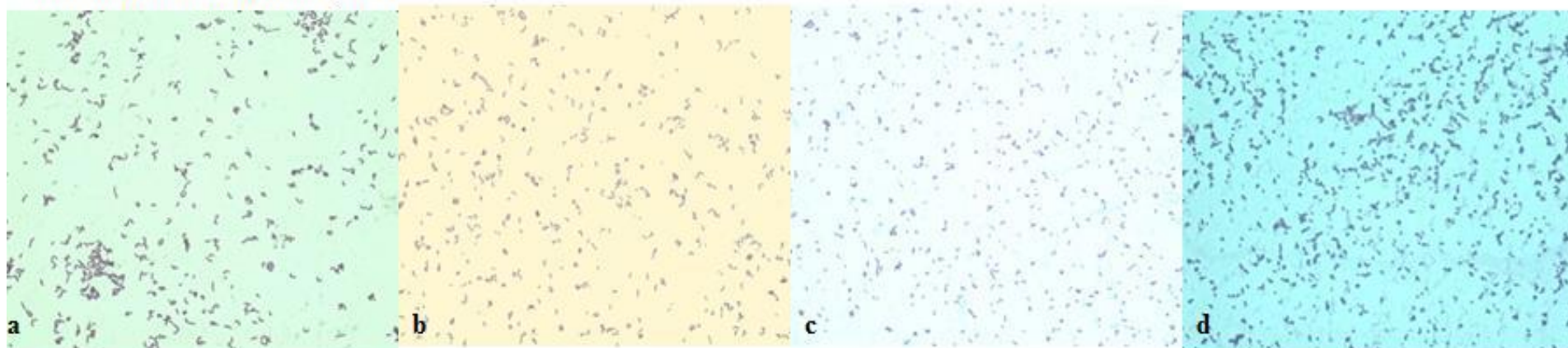


1'Aspecte morfologice ale tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10

Arthrobacter sp. AK-YN10



Arthrobacter nicotinovorans pAO1

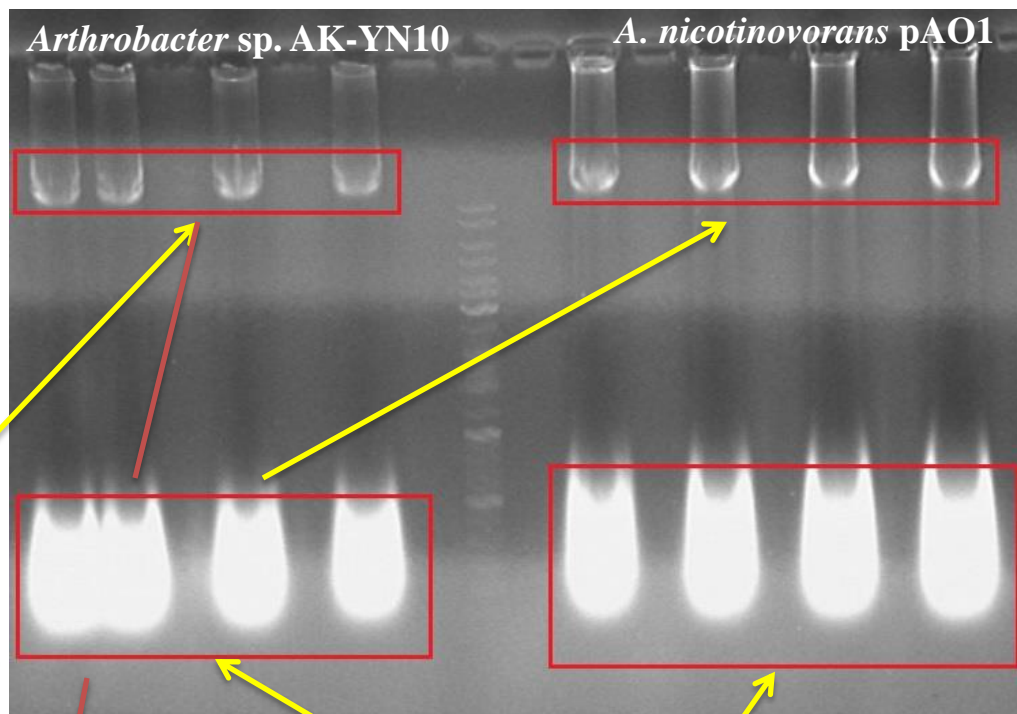


Tulpinile *A. nicotinovorans* pAO1 (ATCC 49919) și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 crescute în mediu citrat lichid la 28°C; **a**, după 12 ore; **b**, după 24 ore; **c**, după 36 ore; **d**, după 48 ore

1. Izolarea și separarea ADN-ului total

Step	Details of following protocol:	
	Screening (1.5–10 ml) ^a	Preparative (600 ml) ^a
Resuspend pelleted cells in 6.7% sucrose–50 mM Tris–1 mM EDTA, pH 8.0	379 μl	30 ml
Warm to 37°C		
Add lysozyme (10 mg/ml in 25 mM Tris, pH 8.0)	96.5 μl	7.5 ml
Incubate for 5 min at 37°C		
Add 0.25 M EDTA–50 mM Tris, pH 8.0	48.2 μl	3.75 ml
Add sodium dodecyl sulfate (20% [wt/vol] in 50 mM Tris–20 mM EDTA, pH 8.0)	27.6 μl	2.25 ml
Mix immediately		
Incubate for 5 to 10 min at 37°C to complete lysis		
Vortex at highest setting for 30 s in an appropriate tube	1.5-ml Eppendorf	15 ml per tube (25 by 150 mm)
Add fresh 3.0 N NaOH	27.6 μl	2.40 ml
Mix gently by intermittent inversion or swirling for 10 min	Inversion	Swirl in 250-ml centrifuge bottle
Add 2.0 M Tris-hydrochloride, pH 7.0	49.6 μl	3.90 ml
Continue gentle mixing for 3 min		
Add 5.0 M NaCl	71.7 μl	5.7 ml
Add phenol saturated with 3% NaCl; mix thoroughly	700 μl	55.8 ml
Centrifuge	5 min	5,000 rpm in GSA rotor, 10 min
Remove upper phase and extract with chloroform-isoamyl alcohol (24:1)	700 μl	55.8 ml
Remove upper phase, precipitate with 1 vol of isopropanol		
Incubate at 0°C	>30 min	>60 min
Centrifuge	5 min	8,000 rpm in GSA rotor, 20 min
Remove excess isopropanol and resuspend in 10 mM Tris–1 mM EDTA, pH 7.5	20 μl	200 μl
Examine 5 to 10 μl by agarose gel electrophoresis		

^a The culture volume used in each protocol is indicated in parentheses.

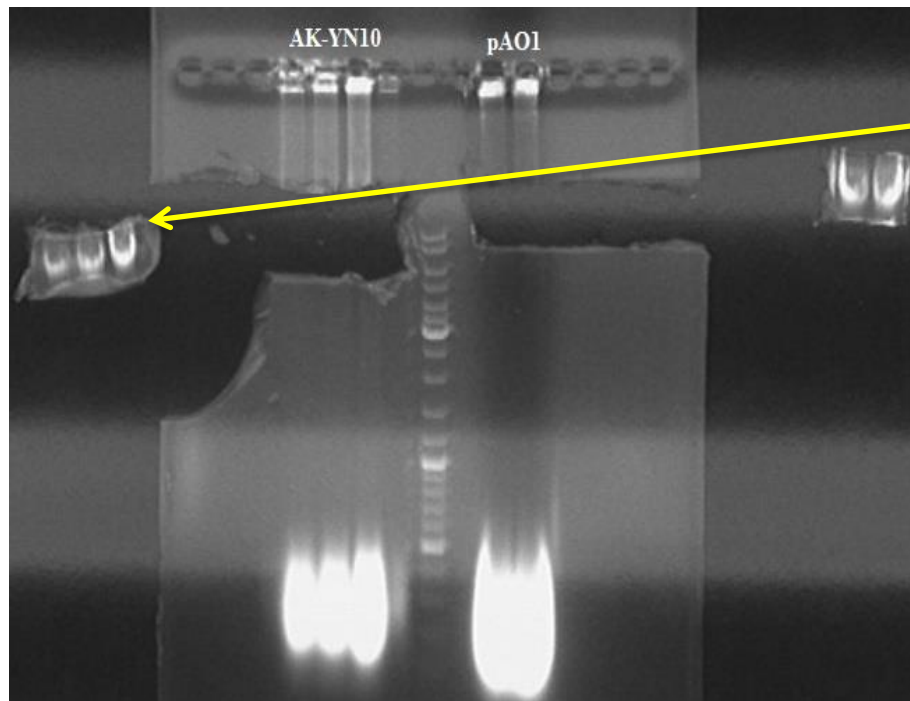


ADN plasmidial

ADN genomic puternic fragmentat

Există cel puțin un plasmid în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10

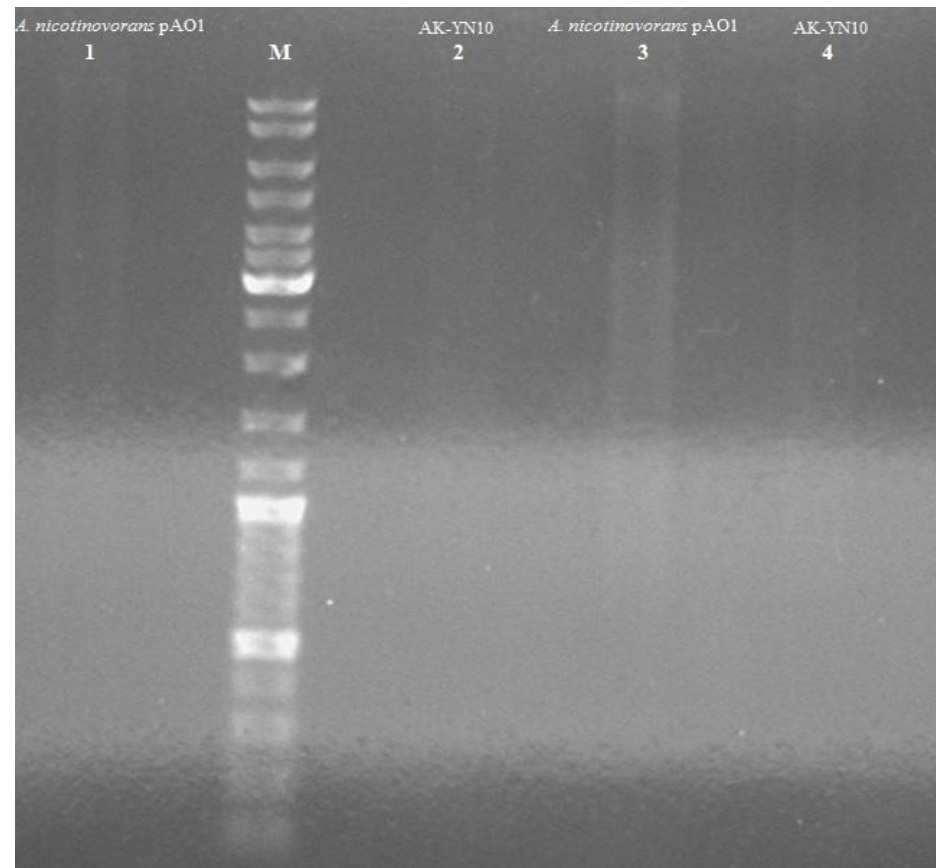
2. Extracția și purificarea ADN-ului plasmidial



**Benzi de ADN plasmidial
tăiate din gel**

+

**Zymoclean™ Gel DNA
Recovery Kit**



**Purificarea ADN-ului plasmidial a
avut succes**

Randament – extrem de scăzut

3. Stabilirea condițiilor optime de amplificare prin PCR

Timpul alocat etapei de sinteză

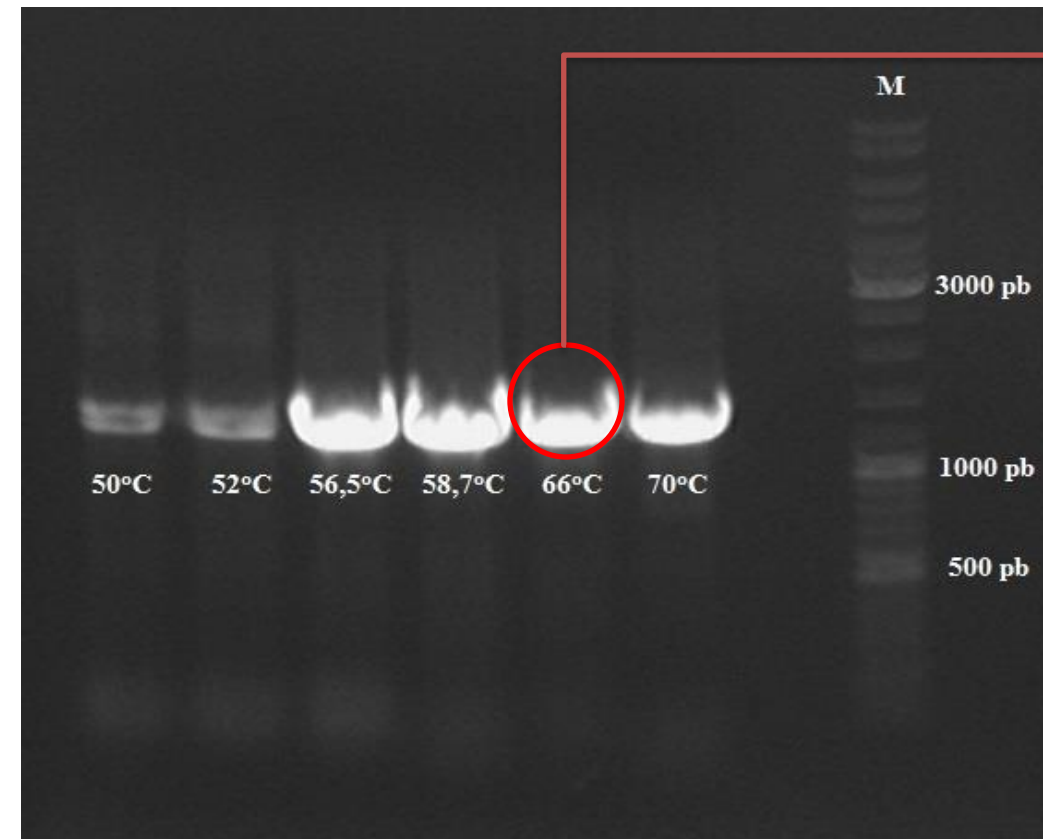
- 1 kb/min
- *6hlnO* (1277 pb) și *sad* (1353 pb)



Durata etapei de sinteză a fost setată la 2 minute

Temperatura optimă de legare a primerilor

- Matriță de ADN: Suspensie celulară de *A. nicotinovorans* pAO1
- Gena amplificată: *6hlnO*
- Concentrația de MgCl₂: 2 mM

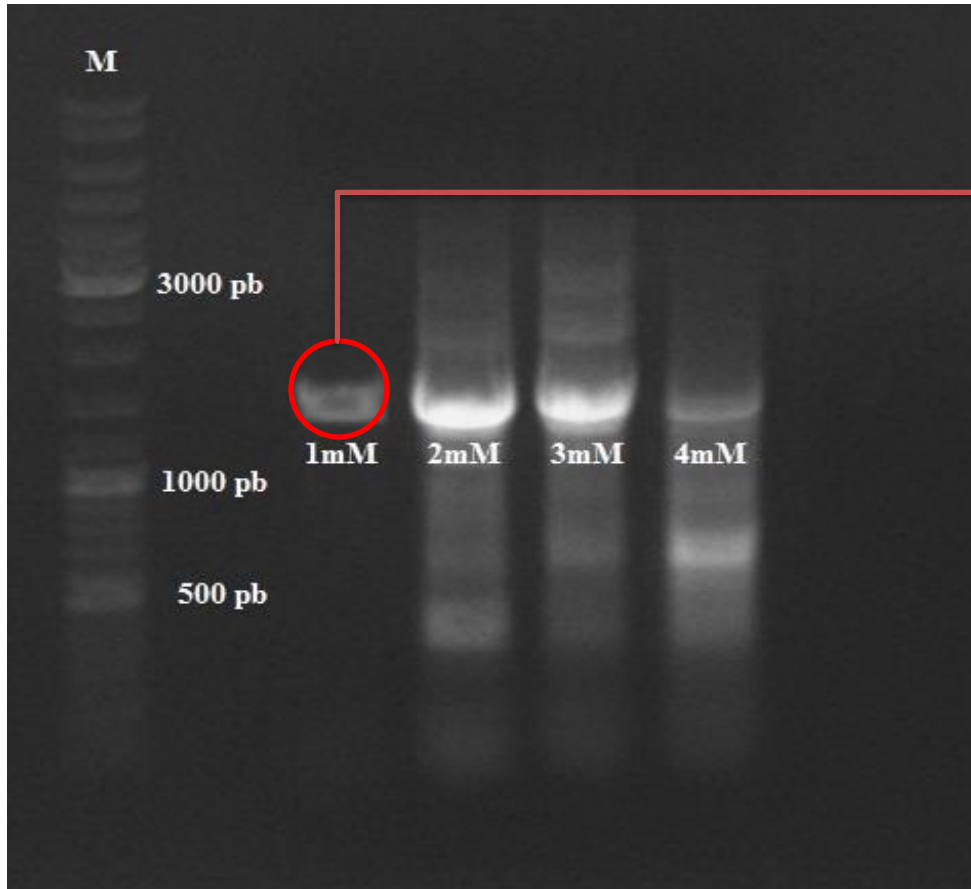


Temperatura optimă de amplificare a *6hlnO*

Concentrația de MgCl₂ a fost stabilită în mod empiric la 2 mM

Concentrația de MgCl₂

- Matriță de ADN: Suspensie celulară de *A. nicotinevorans* pAO1
- Gena amplificată: *sad*
- Temperatura de legare a primerilor : 56,5°C



Concentrația de MgCl₂ utilizată pentru amplificarea *sad*

Temperatura de legare a primerilor a fost stabilită în mod empiric la 56,5°C

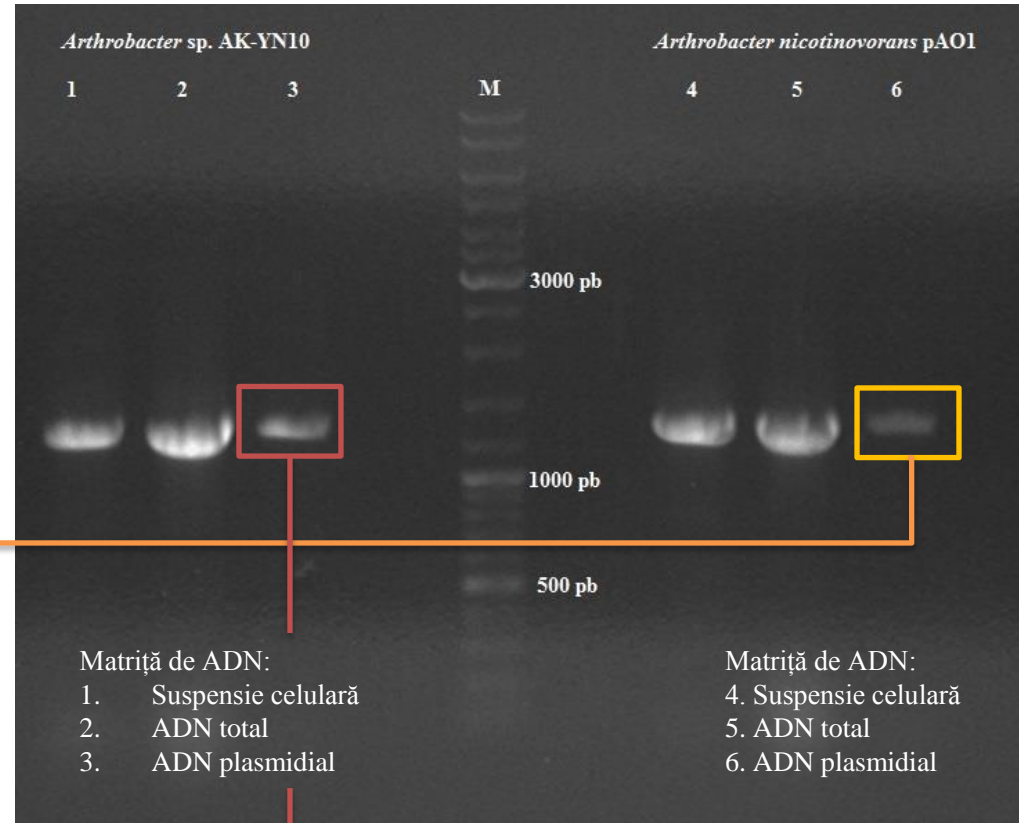
4. Evaluarea prezenței genelor *6hln0* și *sad* în AK-YN10

Amplificarea genei *6hln0* (1277 pb)

Temperatura de legare a primerilor: 66°C

Concentrația de MgCl₂: 2 mM

Durata etapei de sinteză: 2 minute



Gena *6hln0* implicată în calea de degradare a nicotinei este localizată pe pAO1



Gena *6hln0* este, de asemenea, situată pe un plasmid necunoscut în *Arthrobacter* sp. AK-YN10

Amplificarea genei *sad* (1353 pb)

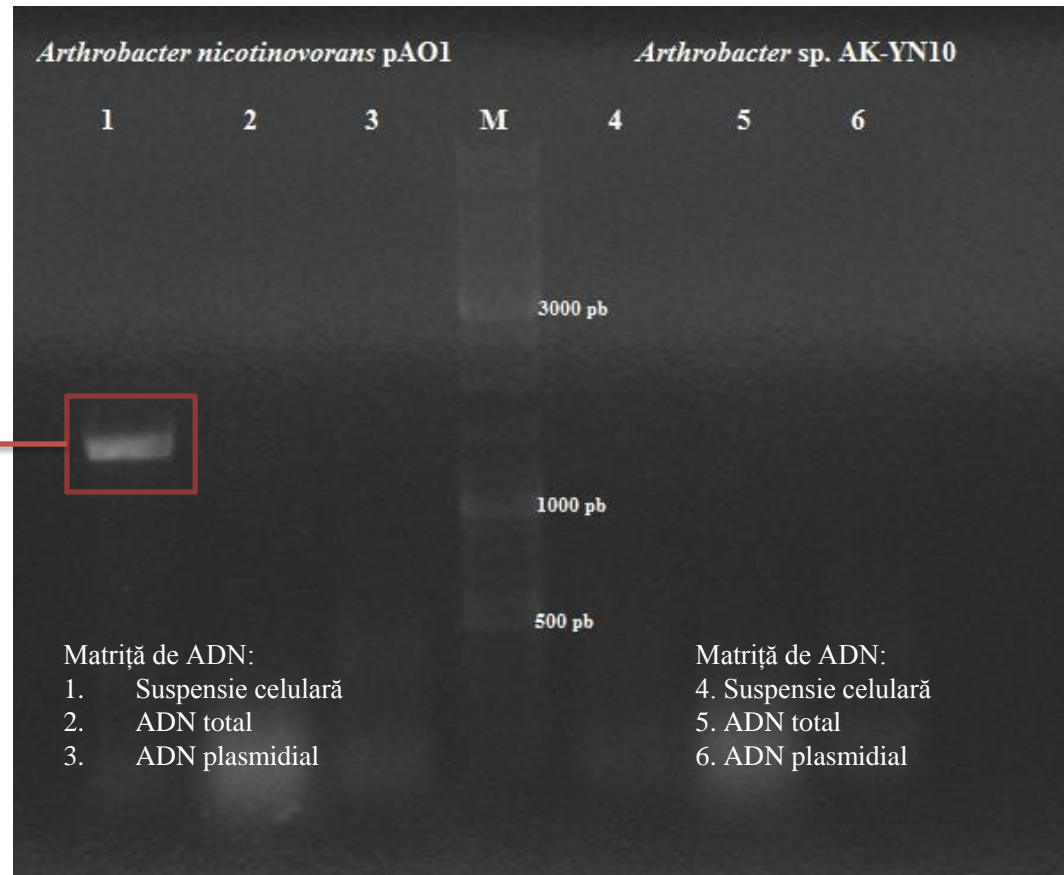
Temperatura de legare a primerilor: **56,5°C**

Concentrația de MgCl₂: **1 mM**

Durata etapei de sinteză: **2 minute**



Gena *sad* a fost amplificată doar din suspensie celulară de *A. nicotinovorans* pAO1



Prezența genei *sad* în AK-YN10 nu a putut fi confirmată



Concluzii



- S-au obținut preparate de ADN total bogate în ADN plasmidial din celulele tulpinilor *A. nicotinovorans* pAO1 și *Arthrobacter* sp. AK-YN10.
- ADN-ului plasmidial a fost purificat, însă cu un randament extrem de scăzut.
- Pentru amplificarea genei *6hlnO*, s-a folosit o temperatura de legare a primerilor de 66°C și o concentrație de MgCl₂ de 2 mM, stabilită în mod empiric.
- Temperatura de legare a primerilor în cazul genei *sad* a fost stabilită în mod empiric la 56,5°C, iar concentrația de MgCl₂ utilizată a fost de 1 mM.
- Gena *6hlnO* este localizată pe plasmidul necunoscut din tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10.
- Prezența genei *sad* în *Arthrobacter* sp. AK-YN10 nu a putut fi confirmată.

Rezultatele obținute au permis:



Lucrări publicate în rezumat:

- **Boiangiu Răzvan Ștefan**, Mihășan Marius, 2017 – Evaluarea prezenței genelor *nic* în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10, *Noi Frontiere în Chimie* 26(2), Universitatea de Vest din Timișoara;

Lucrări prezentate la conferințe științifice:

- **Boiangiu Răzvan Ștefan**, Mihășan Marius – Evaluarea prezenței genelor responsabile de metabolizarea nicotinei în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10 – 3rd edition "Young Researchers in BioScience – International Symposium", Cluj-Napoca, România 25-31 Iulie 2016;
- **Boiangiu Răzvan Ștefan**, Mihășan Marius, 2017 – Evaluarea prezenței genelor *nic* în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10, **Conferință Internațională a Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară**, Timișoara, România 7-9 Iunie 2017;



EVALUAREA PREZENȚEI GENELOR RESPONSABILE DE METABOLIZAREA NICOTINEI ÎN TULPINA *ARTHROBACTER* SP. AK-YN10



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

