

# INACTIVAREA GENEI *6hlnO* DIN *PAENARTHROBACTER NICOTINOVORANS*: ASAMBLAREA VECTORULUI *pH6-Δ6hlnO-* *cmx*



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

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

**Galbur Gabriela**<sup>1</sup>, Răzvan Ștefan Boianțiu<sup>1</sup>, Mihășan Marius<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

# Cuprins



1. Ce este *Paenarthrobacter nicotinovorans*?
2. Potențialul biotehnologic al tulpinii  
*Paenarthrobacter nicotinovoans*;
3. Materiale și metode;
4. Rezultate și discuții;
5. Concluzii

# Caracteristicile microorganismului *Paenarthrobacter nicotinovorans*



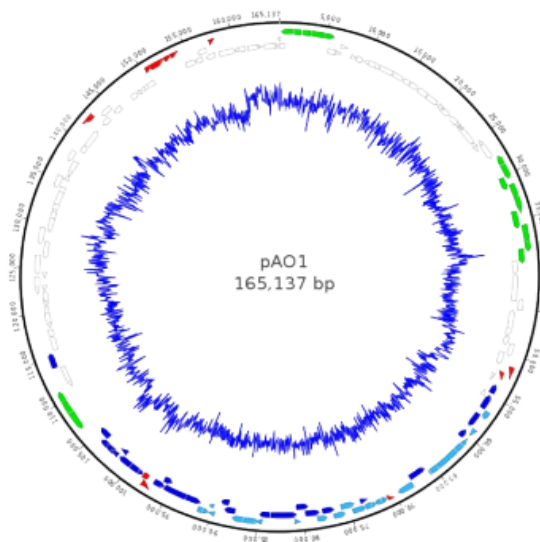
UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

1. Este o actinobacterie Gram pozitivă, strict aerobă;
2. Izolată din solurile cultivate cu tutun;
3. Reprezintă microorganismul gazdă pentru megaplasmidul *pAO1*;
4. Recunoscut pentru abilitatea de a metaboliza niotina;



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



Brandsch și colab., Universitatea Albert Ludwig din Freiburg, Germania

Izolarea și secvențierea plasmidului

*Arthrobacter Oxydans* 1—**pAO1**

- |  |  |                         |  |  |
|--|--|-------------------------|--|--|
|  |  | Metabolismul nicotinei  |  | Transpozoni                                    |
|  |  | Catabolismul glucidelor |  | Replicarea plasmidului, diviziune și conjugare |

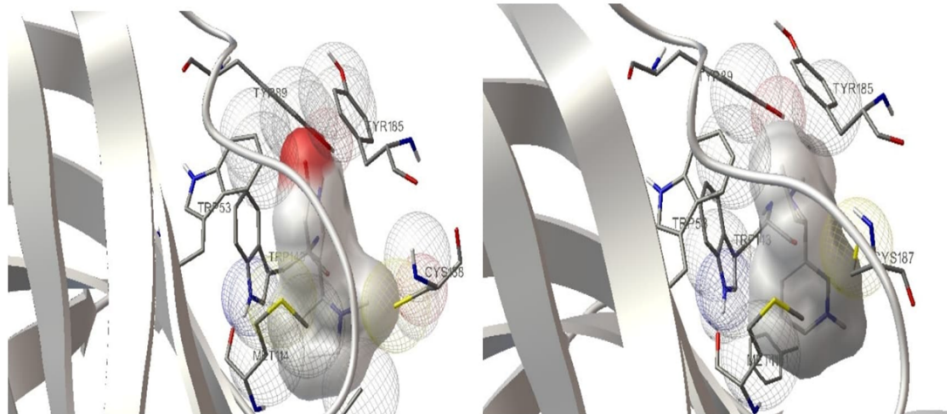


# Degradarea nicotinei → metaboliți intermediari valoroși

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

**Modul de legare a 6-hidroxi-L-nicotinei (A) și nicotinei (B) în situsul receptorilor nicotin-acetilcolinici (nAChR)**



J Physiol Biochem  
DOI 10.1007/s13105-012-0184-9

ORIGINAL PAPER

**6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats**

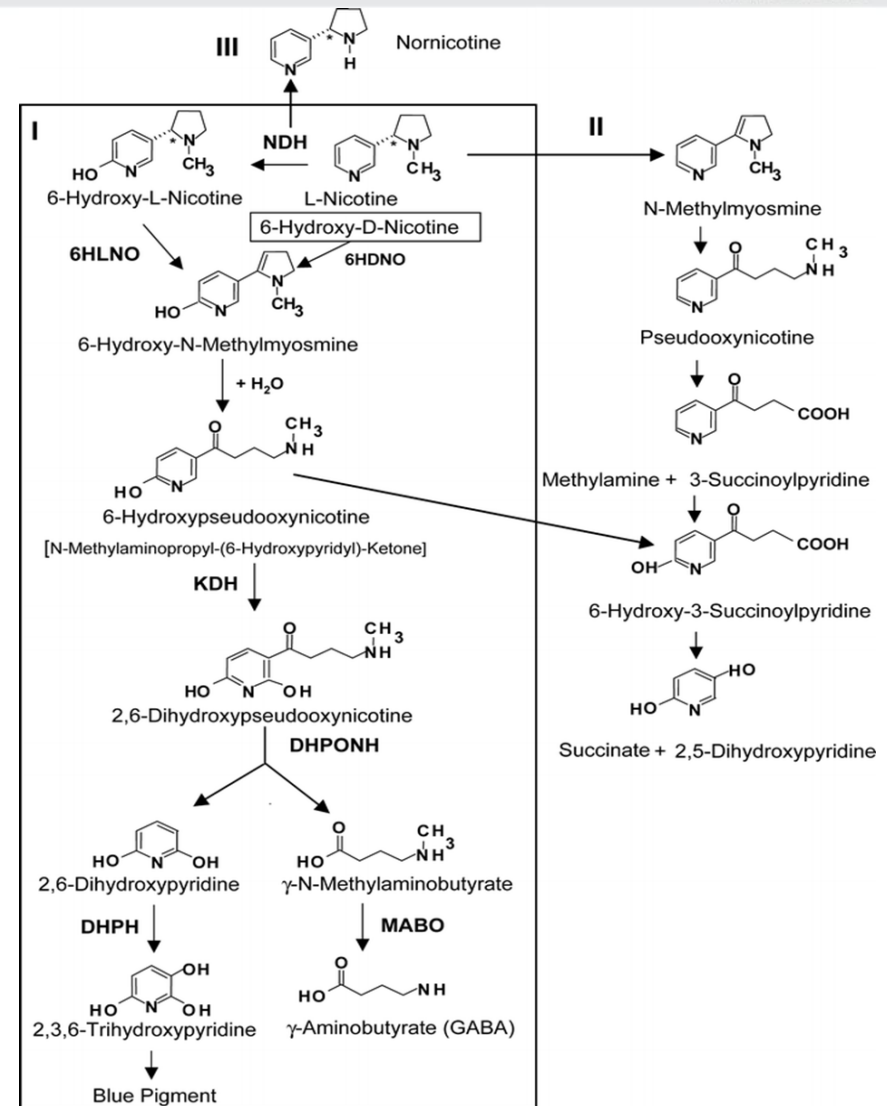
Lucian Hriteu • Marius Stefan •  
Roderich Brandsch • Marius Mihasan

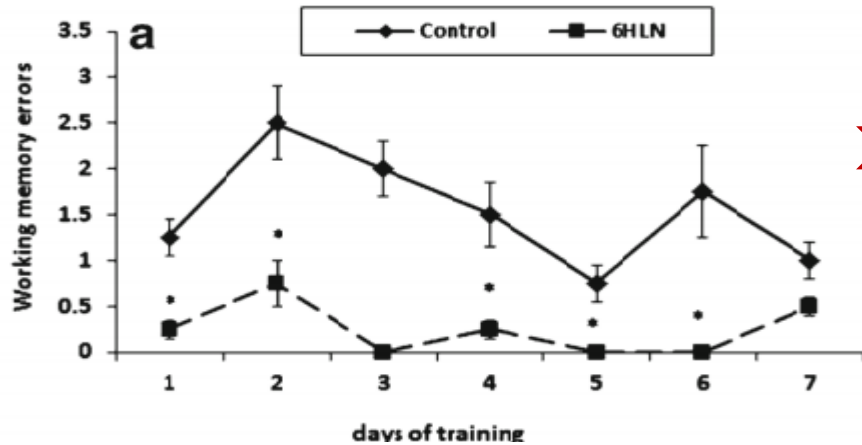
Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 493–498  
DOI 10.1007/s00253-005-0226-0

MINI-REVIEW

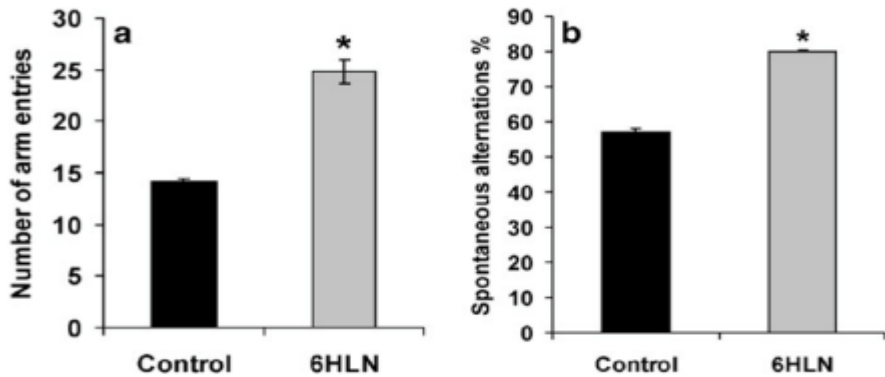
Roderich Brandsch

**Microbiology and biochemistry of nicotine degradation**





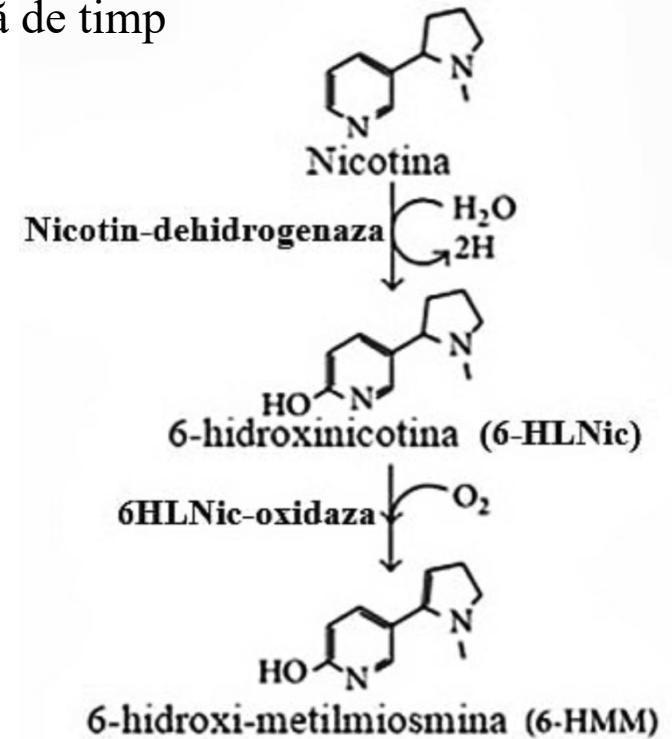
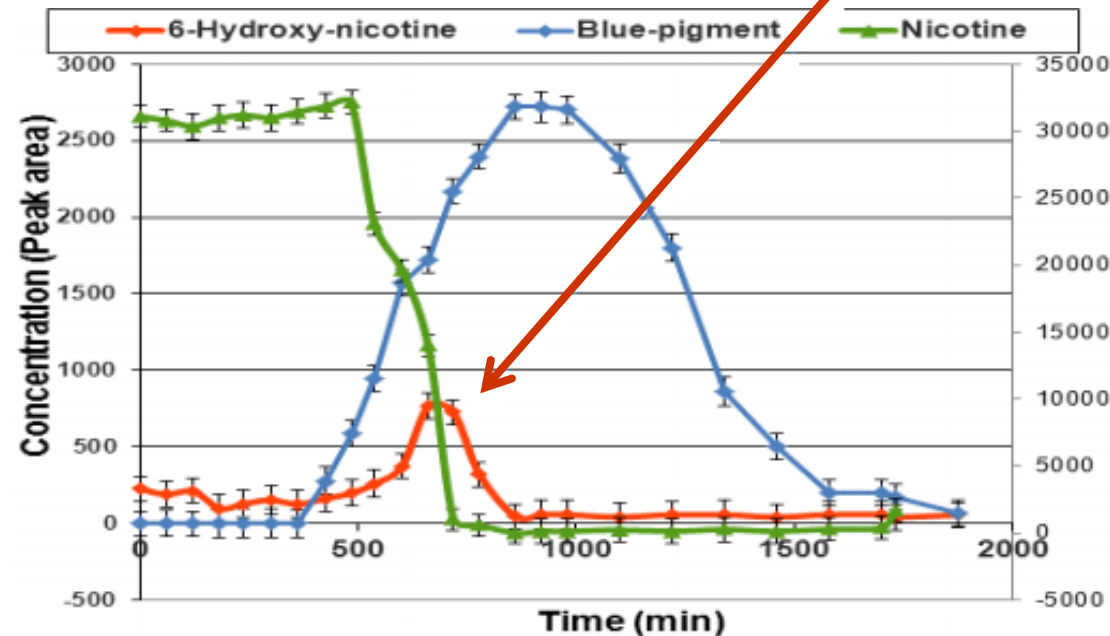
Labirintul cu brațe radiale



Labirintul Y



## 6HNic se acumulează pentru o perioadă scurtă de timp



**Scopul lucrării:** Inactivarea genei ce codifică 6HLNO de pe pAO1 printr-un vector suicidal o cale alternativă de creștere a acumulării a 6HNic în mediu de cultură în vederea izolării

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

**TIME DEPENDENT ACCUMULATION OF NICOTINE DERIVATIVES  
 IN THE CULTURE MEDIUM OF *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*  
 pAO1**

RĂZVAN BOIANGIU<sup>1</sup>, DOINA GUZUN<sup>1</sup>, MARIUS MIHĂȘAN<sup>1\*</sup>



# Materiale și metode



**Tulpini utilizate:** *E. coli* XL1- Blue și *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1

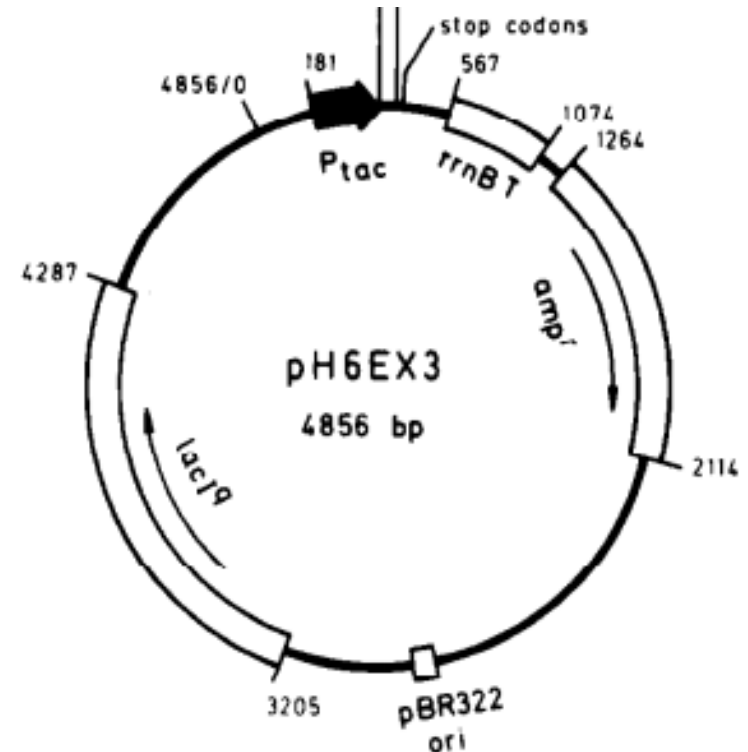
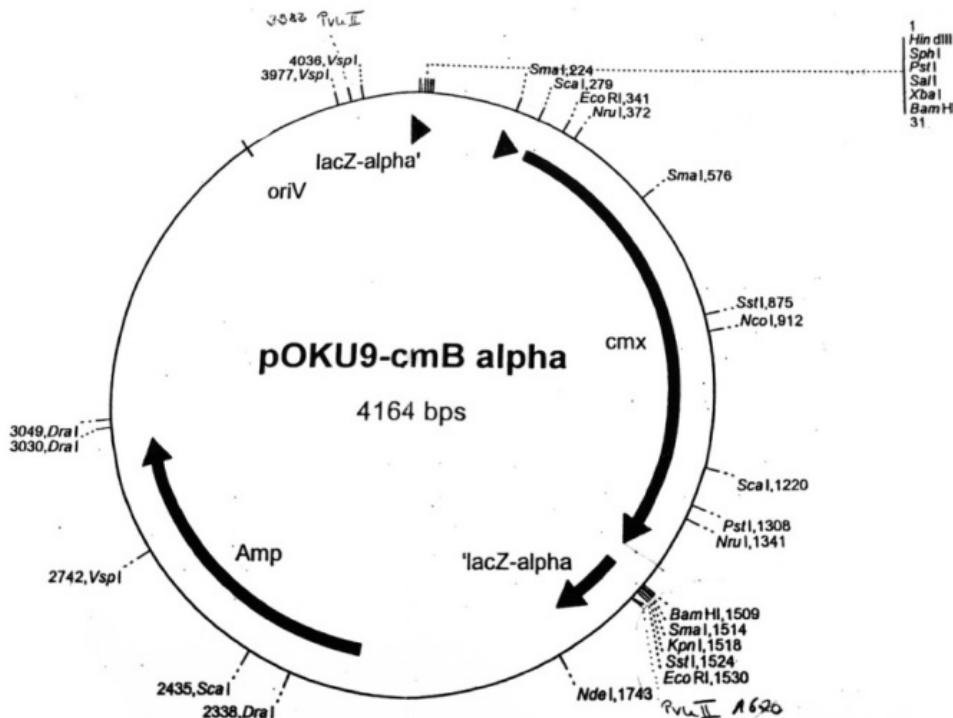


Cultivate pe mediu LB cu tetraciclină



Cultivate pe mediu citrat cu soluție de minerale (5ml/L), kanamicină (70 μg/ml) și 0,05 % nicotină

**Plasmizi utilizați:**





## Izolarea ADN-ului plasmidial



Digestia enzimatică

**BglIII**

**BamH1**



CloneJET™ PCR Cloning Kit Thermo Scientific

Ligarea și transformarea



Purificarea ADN-ului



ZR Plasmid MiniPrep™-Classic kit

Transformare și selecție cu antibiotic



Verificare 

1. Prin digestii
2. Prin PCR

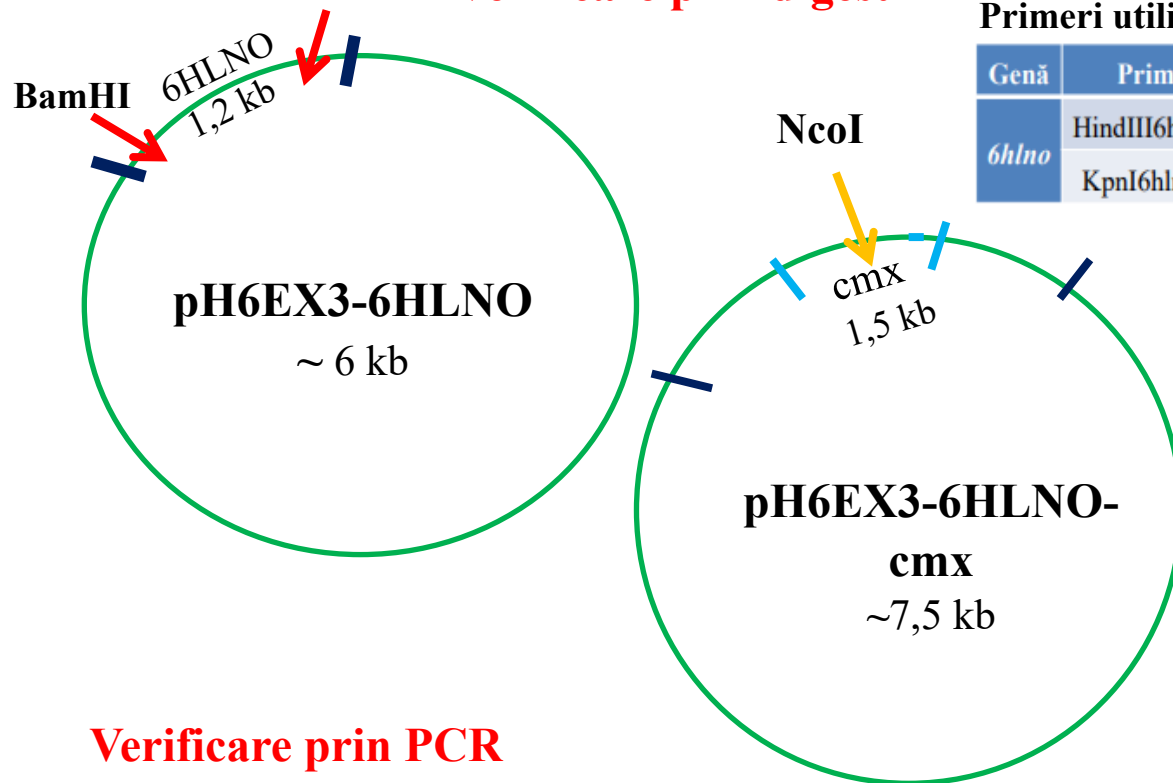


Bio-Rad Gene Pulser W/ Capacitance Extender & Pulse Controller





**BamHI Verificare prin digestii**



**Primeri utilizați:**

Genă	Primer	Secvență
6hln0	HindIII6hlnofw	5' AAG AAG GAA AGC TTT GTA TGA CGC GA3'
	KpnI6hlnorev	5' GTC TGC AGG TAC CTA CGA ATG CAG 3'

**Verificare prin PCR**

**Program PCR**

	Etapa	Temperatura (°C)	Timp
1	Denaturarea inițială (Hot-Start)	95	5 min
2	Denaturare	95	1 min
3	Legare primer	54, 58, 62, 66	45 sec
4	Sintează	72	3 min
	Etapetele 2-4 se repetă de 35 de ori		
5	Finalizarea sintezei	72	10 min
6	Finalizarea reacției	4	-

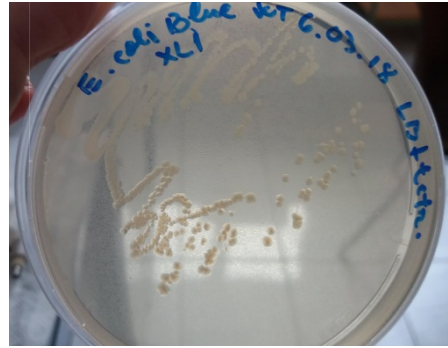


Termociclor Biometra T Gradient

# Rezultate și discuții



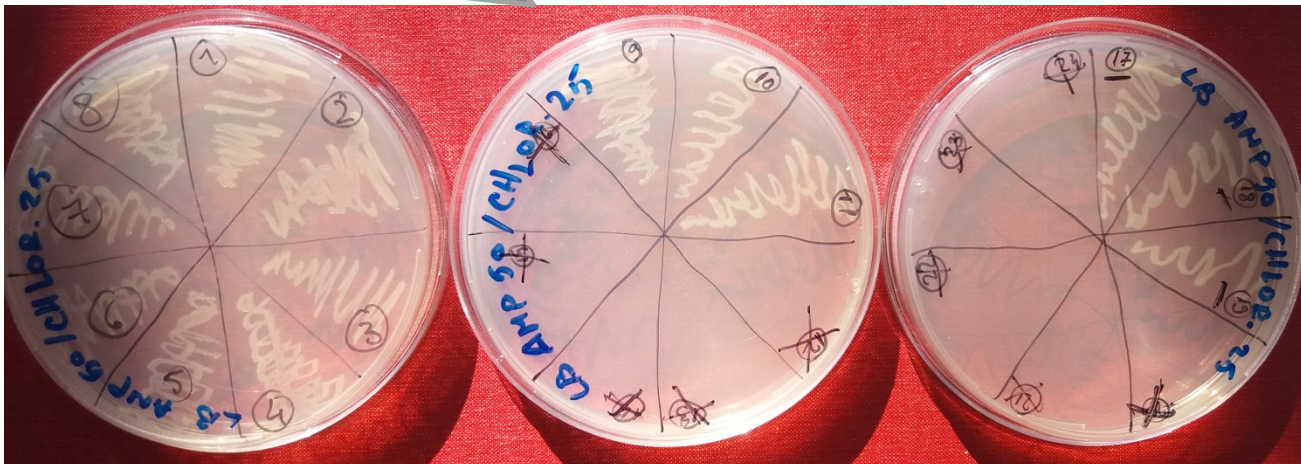
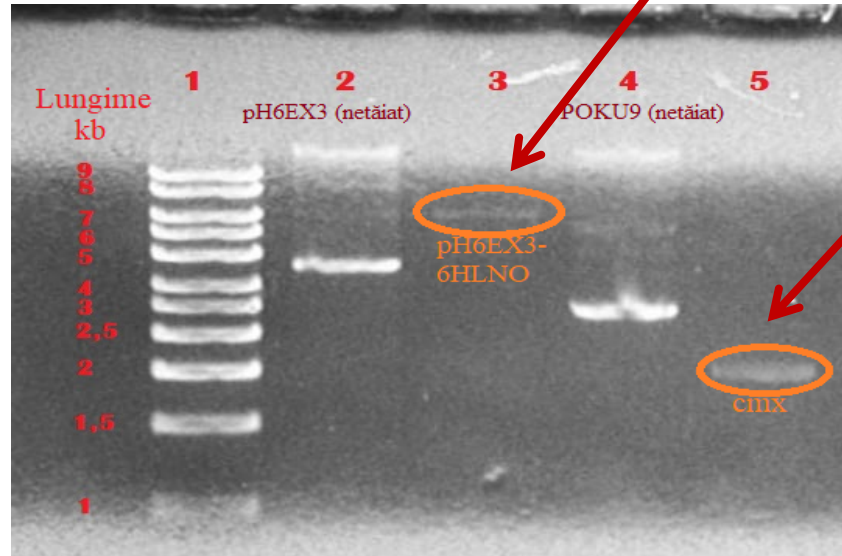
## Digestia enzimatică și inserția cmx în plasmidul pH6-6hln0



Izolare ADN

Ligare  
pH6-Δhln0-  
cmx

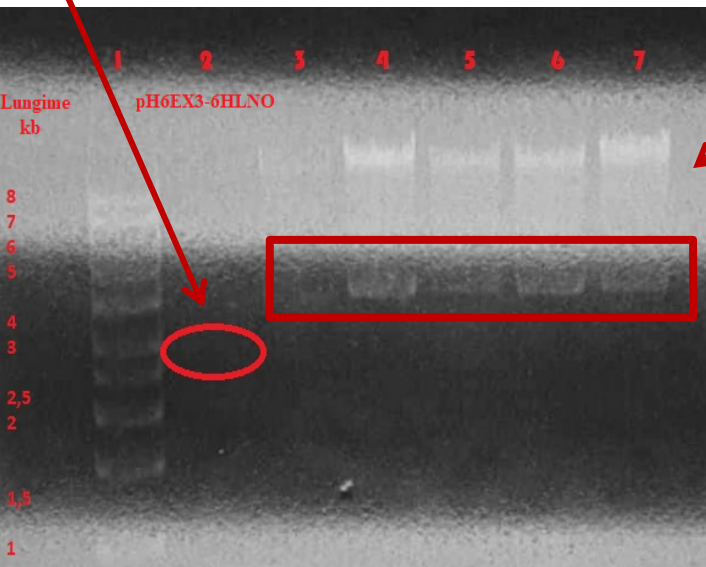
Selecție





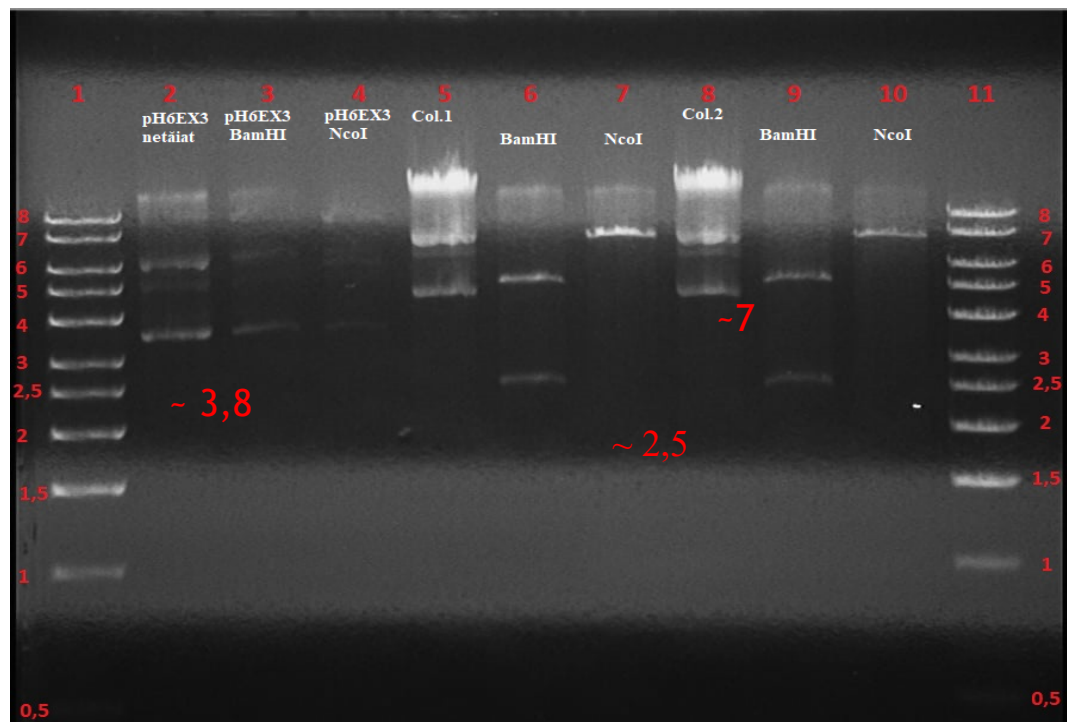
## Verificarea prin electroforeză în gel de agaroză a ADN-ului plasmidial

Vectorul fără  
fragmentul cmx



Transformanți *E.coli*

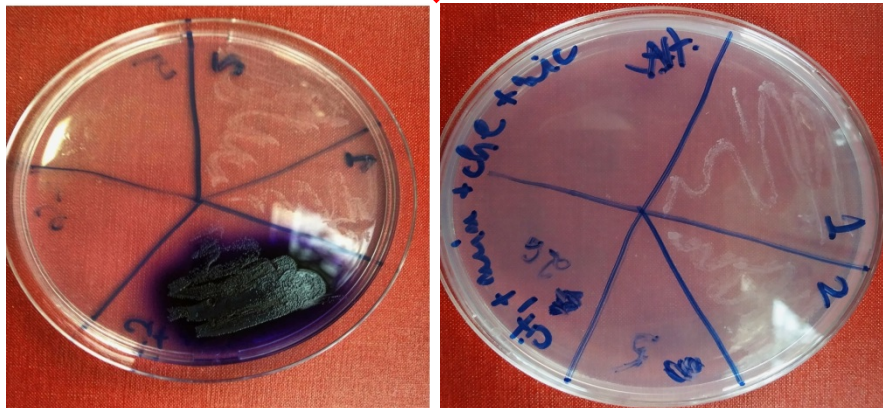
Digestie cu BamHI și NcoI







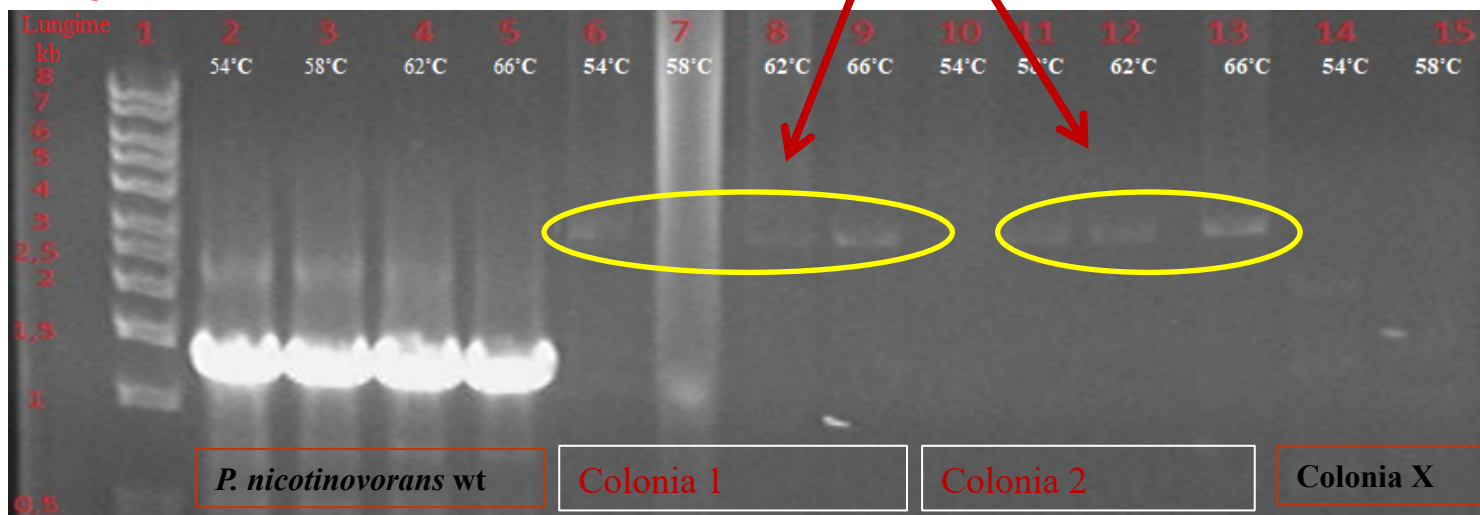
## Transformarea prin electroporare a *P. nicotovorans*



Fragment 6HLNO (~1,2 kb) + Fragment cmx (~1,5 kb) =  
6HLNO-cmx (~3 kb)



### Verificare prin PCR





- ***P. nicotinovorans* este capabil să degradeze nicotina datorită enzimelor codificate de megaplasmidul pAO1;**
- **6HNic este un compus cu proprietăți terapeutice, are efecte pozitive asupra memoriei spațiale și în daunele provocate de stresul oxidativ;**
- **Blocarea catabolismului nicotinei prin întreruperea unei gene reprezintă o strategie alternativă pentru a utiliza tutunul și deșeurile sale ca resursă de biomasă prin transformarea nicotinei în compuși valoroși de piridină;**