

UNIVERSITATEA “ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
SPECIALIZAREA BIOTEHNOLOGII MICROBIENE ȘI CELULARE

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonator științific:

Conf. Dr. Habil. Mihășan Marius

Absolvent:

Boianiu Răzvan Ștefan

Iași

Iulie 2017



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
SPECIALIZAREA BIOTEHNOLOGII MICROBIENE ȘI CELULARE

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

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonator științific:

Conf. Dr. Habil. Mihășan Marius

Absolvent:

Boiangiu Răzvan Ștefan

Iași

Iulie 2017

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
I. CARACTERIZAREA TAXONOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A TULPINII <i>ARTHROBACTER</i> SP. AK-YN10.....	3
I.1. Încadrarea taxonomică a tulpinii <i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10.....	3
I.2. Caracteristici metabolice și fiziologice ale genului <i>Arthrobacter</i>	6
II. GENOMUL TULPINII <i>ARTHROBACTER</i> SP. AK-YN10	13
II.1. Caracteristici generale ale genomului tulpinii <i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10.....	13
II.2. Gene implicate în metabolismul atrazinei în <i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10.....	14
II.3. Gene implicate în mobilitate.....	16
II.4. <i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10 și <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1	16
III. MATERIALE ȘI METODE.....	23
III.1. Tulpini utilizate și condiții de cultivare.....	23
III.1.1. Tulpinile utilizate.....	23
III.1.2. Condiții de cultivare	24
III.1.3. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate	25
III.2. Izolarea ADN-ului plasmidial	26
III.2.1. Izolarea ADN-ului plasmidial prin metoda lizei alcaline.....	26
III.2.2. Extracția ADN-ului total	29
III.2.3. Precipitarea ADN-ului cu solvenți organici	29
III.2.4. Separarea electroforetică a ADN-ului total	30
III.2.5. Izolarea ADN-ului plasmidial din geluri de agaroză.....	30
III.3. Electroforeză în geluri de agaroză.....	32
III.4. Amplificarea ADN-ului prin PCR.....	37

IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII	41
IV.1. Aspecte morfologice ale tulpinii <i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10	41
IV.2. Izolarea și separarea ADN-ului total din celulele de <i>Arthrobacter</i>	43
IV.3. Purificarea ADN-ului plasmidial.....	45
IV.4. Stabilirea condițiilor optime de amplificare prin PCR.....	47
IV.4.1. Alegerea primerilor pentru amplificarea genelor de interes.....	47
IV.4.2. Condițiile esențiale pentru reacția de amplificare	51
IV.5. Evaluarea prezenței genelor <i>6hln</i> și <i>sad</i> în AK-YN10	55
CONCLUZII.....	59
VI. ANEXE – Fotografiiile gelurilor obținute în cadrul acestui studiu.....	61
BIBLIOGRAFIE	63

INTRODUCERE

Arthrobacter nicotinovorans este o bacterie Gram pozitivă, frecvent întâlnită în sol. Numele speciei reflectă principala caracteristică metabolică, și anume abilitatea de a degrada nicotina. Capacitatea speciei *Arthrobacter nicotinovorans* de a degrada nicotina este legată de prezența megaplasmidului pAO1, pe care se află grupul de gene *nic* ce codifică enzimele implicate în această cale metabolică (Mihășan, 2011).

Într-un studiu recent (Sagarkar et al., 2014), a fost raportată schița secvenței genomice a unui izolat bacterian capabil să degradeze erbicidul atrazină - *Arthrobacter* sp. AK-YN10. Această tulpină a fost izolată dintr-un sol agricol din regiunea centrală a Indiei pe care a fost cultivat trestie de zahăr și care a fost tratat intens în ultimii trei ani cu atrazină. Tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10 a fost încadrată în genul *Arthrobacter* pe baza secvenței genei ARN ribozomal 16S și pe capacitatea acestui microorganism de a degrada compuși toxici, precum atrazina (Sagarkar et al., 2016).

Secvențele megaplasmidului pAO1 al speciei *Arthrobacter nicotinovorans* prezintă un grad ridicat de similaritate în regiunea genelor *nic* față de trei schițe genomice ale unor tulpini noi din genul *Arthrobacter*: M2012083, SJCon și AK-YN10 (Mihășan, 2016).

Obiectivul acestui studiu este de a identifica dacă tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10 conține gene din grupul de gene *nic* și de a stabili locația acestora – pe cromozomul bacterian sau pe un eventual plasmid. Pentru aceasta, ADN-ul plasmidial a fost izolat din celulele de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și prezența a două gene *nic* a fost evaluată prin PCR.

Experimentele realizate în cadrul acestui studiu s-au efectuat în laboratorul de cercetare B128 al Facultății de Biologie din cadrul Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, sub coordonarea domnului Conferențiar Dr. Habilitat Marius Mihășan în perioada 15.01.2016 – 15.03.2016. Aspectele morfologice și tinctoriale au fost investigate la microscopul confocal sub îndrumarea doamnei Șef Lucrări Dr. Anca Narcisa Neagu în perioada 26.08.2016 – 12.09.2016.

I. CARACTERIZAREA TAXONOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A TULPINII *ARTHROBACTER* SP. AK-YN10

I.1. Încadrarea taxonomică a tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10

Un studiu recent (Sagarkar et al., 2016) a raportat izolarea și caracterizarea unei tulpini bacteriene, *Arthrobacter* sp. AK-YN10, care ar putea fi utilizată în decontaminarea (bioremedierea) solurilor poluate cu s-triazină. În această lucrare, tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10 este abreviată AK-YN10.

Această tulpină degradează copuşii similari s-triazinei din pesticide și a fost izolată dintr-un câmp de trestie de zahăr din zona centrală a Indiei unde s-a folosit în repetate rânduri atrazină. S-a demonstrat că AK-YN10 degradează 99% din atrazina dintr-un mediu suplimentat cu 1000 mg L⁻¹ de erbicid în 30 de ore (Sagarkar et al., 2016).

Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-izopropilamino-1,3,5-triazina) este un erbicid ce face parte din grupul s-triazinelor. Din cauza utilizării lor excesive și a persistenței ridicate atrazina și metaboliții derivați din atrazină sunt identificați în sol și în ape (Sagarkar et al., 2014). Acumularea atrazinei în mediu reprezintă un motiv de îngrijorare, deoarece mai multe studii (Hayes et al., 2010) au arătat că această substanță este un puternic disruptor endocrin ce cauzează inversarea sexului la broaște.

Din medii de cultură îmbogățite, a fost izolată o tulpină bacteriană Gram pozitivă, cu colonii de culoare galbenă și cu marginile netede, ce produce o zonă clară pe plăci cu mediu de bază (mediu BS) suplimentat cu atrazină. Izolatul numit AK-YN10, a fost încadrat în genul *Arthrobacter* pe baza secvenței genei ARN ribozomal 16S. Legăturile dintre speciile genului *Arthrobacter* pot fi observate în figura 1.

În anul 1986, Bergey a inclus genul *Arthrobacter* în Secțiunea 15 – Bacili Gram pozitivi neregulați și nesporulanți, Clasa *Thallobacteria*, Divizia *Firmicutes*, Regn *Procariota*, clasificarea făcându-se pe baza caracterelor fiziologice și biochimice (chemotaxonomie).

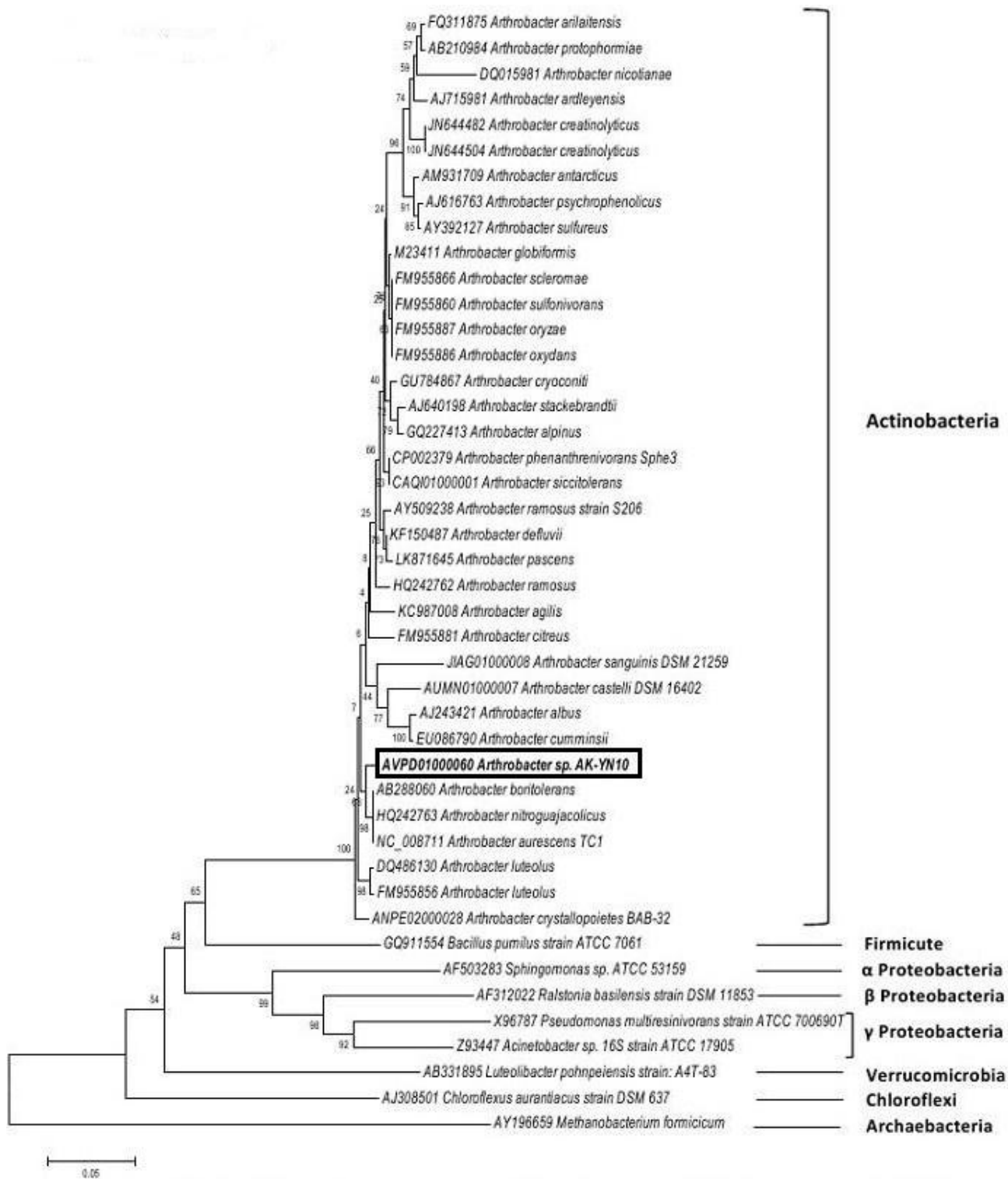


Figura 1. Arbore filogenetic care arată relația dintre secvențele ARN ribozomal 16S ale tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și a altor specii din genul *Arthrobacter*. Scala de jos reprezintă 0,05 substituții nucleotidice/100 nucleotide (Sagarkar et al., 2016)

Conform Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2009), secvențele de ARN ribozomal acumulate de la bacteriile coreiforme aerobe și facultativ aerobe ne ajută să

stabilim o legătură taxonomică și filogenetică. Aceste bacterii fac parte din grupul *Arthrobacter*. În acest grup se găsesc patru subgrupuri: *Microbacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter* și *Dermatophilus*. Subgrupul *Arthrobacter* cuprinde la rândul său genurile *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Renibacterium* și *Rothia* (Loveland-Curtze și colab., 1999).

Îmbinând taxonomia tradițională cu analiza secvenței ARN ribozomal 16S, genul *Arthrobacter* a fost încadrat în familia *Micrococcaceae* și în comparație cu alte genuri ale familiei, această familie conține cel mai mare număr de specii. De asemenea, în această familie este încadrat și genul *Micrococcus*.

În anul 1997, Stackebrandt și colab. propun clasa *Actinobacteria* în care se încadrează subclasa *Actinobacteridae*, ordinul *Actinomycetales*, subordinul *Micrococcineae* și familia *Micrococcaceae*. Relațiile dintre unitățile taxonomice superioare pot fi observate în figura 2.

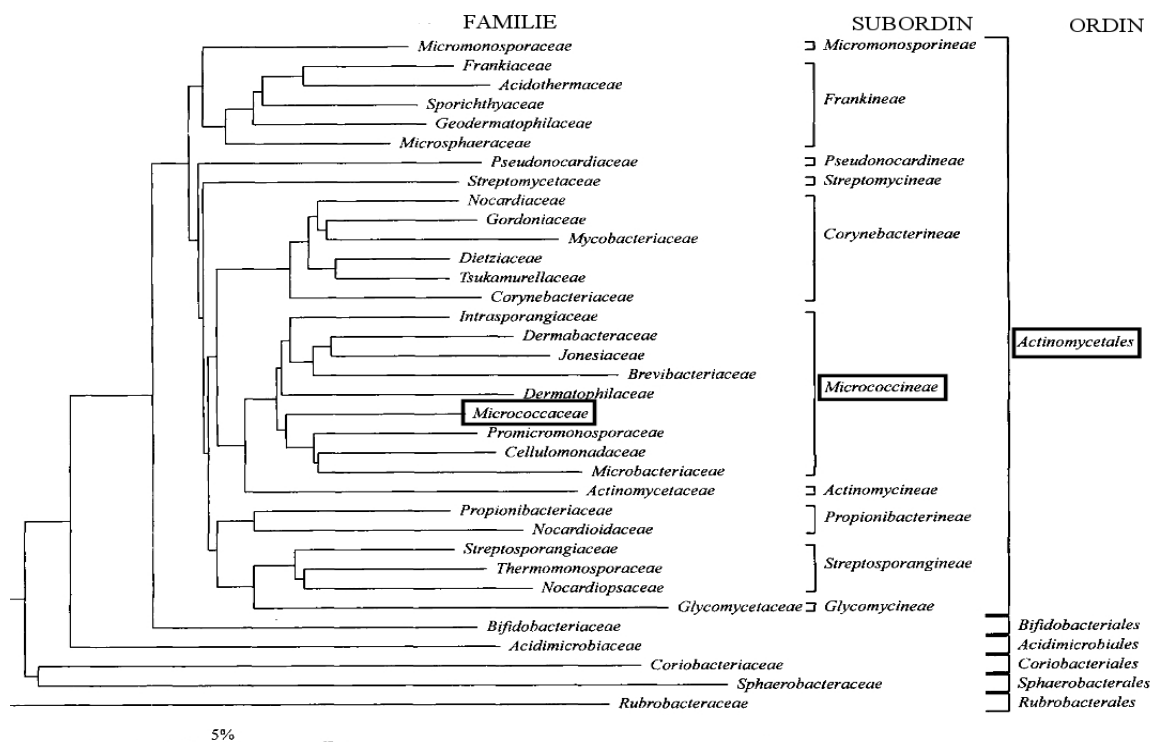


Figura 2. Legăturile filogenetice dintre diversele unități taxonomice din cadrul subclasei *Actinobacteridae*. Scala de jos reprezintă 5 substituții nucleotidice/100 nucleotide (Stackebrandt et al., 1997)

La ora actuală, au fost descrise 66 de specii ce aparțin genului *Arthrobacter* și a fost împărțit în cel puțin 11 grupe pe baza secvenței ARN ribozomal 16S, sistemul chinonă și structura peptidoglicanului (Busse și Wieser, 2014).

I.2. Caracteristici metabolice și fiziologice ale genului *Arthrobacter*

Unele caracteristici remarcabile ale speciilor din genul *Arthrobacter* constau în schimbarea formei celulelor în timpul ciclului de viață (din forma bacilară în cea cocoidă) (Keddie și Jones, 2006; Mihășan, 2011), compoziția chimică a peretelui celular (Mihășan, 2011), rezistența la desicare (Boylen, 1973), radiații ionizante (Fredrickson et al., 2004) și la temperaturi scăzute (Ganzert și colab., 2011) precum și capacitatea lor de a metaboliza o largă varietate de compuși naturali și artificiali, inclusiv nicotina (Brandsch, 2006), fenantrenul (Kallimanis et al., 2011), 4-clorofenolul (Westerberg și colab., 2000), dimetil-sulfona (Borodina et al., 2002), cromul hexavalent (Megharaj et al., 2003) și atrazina (Sagarkar et al., 2014).

Variabilitatea în formă și dimensiune a celulelor de-a lungul ciclului celular este o importantă caracteristică a acestui gen. Transferul celulelor cocoide din faza staționară pe un mediu de cultură proaspăt determină producerea unor excrescențe dând astfel naștere la bacili cu formă neregulată caracteristici fazei exponențiale. Acești bacili se așează în formațiuni unghiulare asemenea unor V-uri. Mai poate apărea o ramificație primară, dar nu se produc micelii adevărate (ramificație secundară). Bacilii nu formează endospori, sunt imobili (rareori mobili prin intermediul unor flageli laterali) și devin mai scurți pe măsură ce cultura îmbătrânește urmând apoi ca din forma bacilară să treacă în forma cocoidă specifică fazei staționare. În ambele etape ale ciclului de creștere, bacteriile din cadrul genului *Arthrobacter* sunt Gram-pozitive dar ulterior acestea devin Gram-variabile (Boiangiu și Mihășan, 2015).

Acest ciclu de creștere (coco-bacil) este o trasătură distinctivă a genului dar, de asemenea, apare și în alte genuri precum *Brevibacterium* și cel puțin unii membrii din *Rhodococcus* (figura 3) (Mihășan, 2011).

Chemoorganotrofic, genul *Arthrobacter* include specii aerobe, cu metabolismul de tip respirator, iar temperatura optimă de creștere și dezvoltare este cuprinsă între 25-30°C. O creștere moderată poate avea loc pe un mediu ce conține extract de drojdie și peptonă la un pH aproape neutru. Pe mediul cu peptonă, în urma metabolizării glucozei și a altor glucide se formează cantități mici sau chiar deloc de acizi. Aceste bacterii nu hidrolizează celuloza dar sunt capabile să își sintetizeze enzime precum catalaza și deoxiribonucleaza. Unele specii necesită biotină ca factor de creștere (Keddie et al., 1986).

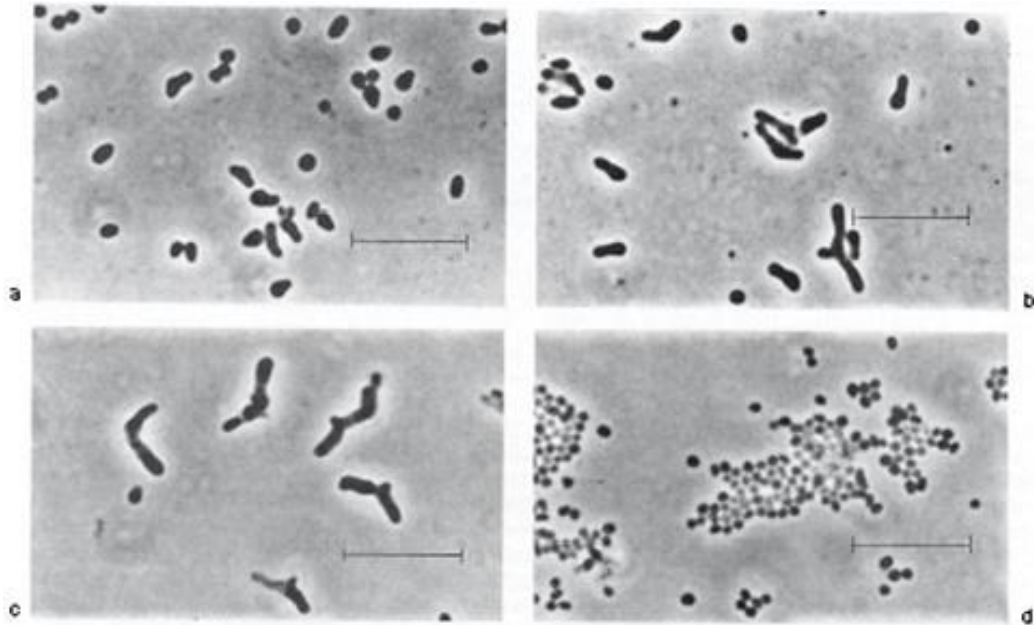


Figura 3. *Arthrobacter globiformis* (ATCC 8010) crescut pe mediu EYGA la 25 C. Inoculul a fost alcătuit din celule cocoide; **a**, după 6 ore, formarea de bacili din celule cocoide; **b**, după 12 ore; **c**, după 24 ore; **d**, după 3 zile (scala este de 10 µm) (Keddie și Jones, 2006)

Conținutul de G+C din bacteriile genului *Arthrobacter* este relativ mare, în medie de 59-70%. Genomul tulpinii AK-YN10 are un conținut de G+C de 63,3%, ceea ce corespunde foarte bine cu caracteristica genului (Sagarkar et al., 2014).

Dacă ținem cont de sistemul chinonic și structura peptidoglicanului, genul *Arthrobacter* poate fi divizat în două grupe majore: un grup este caracterizat printr-un sistem chinonă cu menachinonă monosaturată [MK-8(H₂) și/sau MK-9(H₂)] și peptidoglican de tipul A3α, iar cel de-al doilea grup se caracterizează printr-un sistem chinonă cu menachinonă nesaturată (MK-8, MK-9, și/sau MK-10) și peptidoglican de tipul A4α (Keddie et al., 1986).

În funcție de specie, variațiile A3α și A4α ale peptidoglicanului sunt caracterizate prin legăturile dintre pozițiile 3 și 4 a celor două unități peptidice ce sunt realizate de un număr diferit de punți interpeptidice. Punțile interpeptidice din peptidoglicanul de tip A3α conțin numai acizi monocarboxilici și/sau glicină, iar cele din A4α conțin întotdeauna acid dicarboxilic și în cele mai multe tulpini conțin, de asemenea, alanină (Schleifer și Kandler, 1972).

Compoziția chimică a peretelui celular reprezintă o altă caracteristică ce poate fi utilizată pentru identificarea speciilor ce aparțin genului *Arthrobacter*. De cele mai multe ori, acidul gras din componența peretelui celular este 1,3-metilpentadecanoic, iar diamino-acidul întâlnit preponderent în peptidoglican este lizina. Peptidoglicanul este de tipul Lys-Ala-Tre-Ala (Mihășan, 2011).

Mobilitatea este un fenotip interesant pentru tulpinile microbiene implicate în bioremediere. Prin urmare, Sagarkar și colab. (2016) au efectuat teste de mobilitate pe agar moale

și au căutat gene flagelare în schița genomului tulpinii AK-YN10. Pentru a testa motilitatea, un mediu de cultură a fost însămânțat prin înțepare cu *A. aurescens* TC1 și AK-YN10 și apoi a fost incubat la 30°C timp de 72 de ore până când creșterea a fost evidentă. Aspectul funcțional al genelor implicate în codificarea flagelilor este demonstrat în figura 4 prin testarea mobilității pe agar moale (Sagarkar et al., 2016).

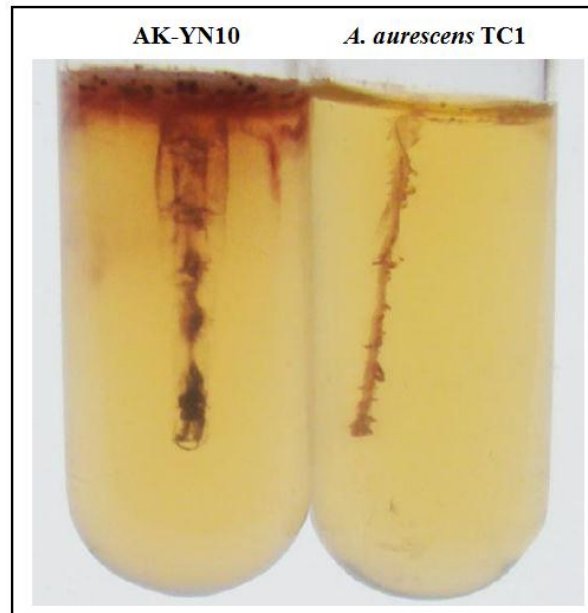


Figura 4. Mobilitatea flagelară testată pe agar moale, difuzia culorii indicând mobilitatea bacteriană (Sagarkar et al., 2016)

Bacteriile din genul *Arthrobacter* posedă diverse căi metabolice, cele mai multe fiind codificate plasmidial, pentru detoxifierea unor compuși xenobiotici (tabel 1) (Igloi și Brandsch, 2003; Jerke et al., 2008). Membrii acestui gen sunt omniprezente, datorită versatilității lor metabolice și toleranțe la stresul mediului înconjurător (Niewerth et al., 2012). Aceștia sunt capabili să utilizeze un număr mare de substraturi ca sursă de carbon sau azot și deci ocuparea a numeroase nișe ecologice (Mihășan, 2011). De obicei, în urma metabolizării acestor substraturi, se formează un pigment specific.

Tabel 1. Caracteristici ale tulpinii AK-YN10 în comparație cu alte tulpini din genul *Arthrobacter* cu secvențele genomice complete disponibile în baza de date NCBI (Sagarkar et al., 2016)

Nr. Crt.	Tulpina bacteriană	Număr de acces GenBank	Caracteristică metabolică sau fiziologică	Plasmide	Mobilitate	Referință
1.	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	CP000474	Degradarea atrazinei	TC1 (CP000475) TC2 (CP000476)	-	(Mongodin et al., 2006)
2.	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	CP001341	Degradarea 4-clorofenolului	pACHL01 (CP001342) PACHL02 (CP001343)	+	(Nordin et al., 2005)
3.	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	CP002379	Degradarea fenantrenului	pASPHE301 (CP002380) pASPHE302 (CP002381)	-	(Kallimanis et al., 2011)
4.	<i>Arthrobacter sp.</i> Rue61a	CP003203	Degradarea chinaldinei	Plasmid p232 (CP003204) Plasmid pAL1 (CP003205)	-	(Niewerth et al., 2012)
5.	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	FQ311875	Izolate de la suprafața brânzei	pRE117-1 (FQ311475) pRE117-2 (FQ311476)	-	(Monnet et al., 2010)
6.	<i>Arthrobacter sp.</i> FB24	CP000454	Rezistență la un nivel ridicat de cromat	Plasmid1 (CP000455) Plasmid2 (CP000456) Plasmid3 (CP000457)	-	(Henne et al., 2009)
7.	<i>Arthrobacter sp.</i> PAMC25486	CP007595	Crește la temperaturi scăzute (10-25°C)	-	#	-
8.	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1	AJ507836	Degradarea nicotinei	pAO1 (AJ507836.1) pART1 pART2 (DQ191047) pART3 (DQ191048)		(Igloi și Brandsch, 2003; Sandu et al., 2005)
9.	<i>Arthrobacter sp.</i> AK-YN10	AVPD00000000	Degradarea atrazinei, nicotinei și a clorpirifosului	4 plasmizi	+	(Sagarkar et al., 2014, 2016)

#Informație care nu este disponibilă

Capacitatea tulpinii AK-YN10, de a degrada atrazina a fost demonstrată prin monitorizarea consumului (figura 5A) și mineralizării (figura 5B) acestui compus. Rata de degradare a atrazinei a fost de aproximativ 36 mg/L/oră, cu un timp de înjumătățire a atrazinei de 9,44 ore și o rată de creștere a sușei AK-YN10 de 0,24 DO/mL/zi (tabel 2). Mineralizarea atrazinei a fost analizată prin radio-respirometrie, marcându-se radioactiv catenele laterale și inelul aromatic din structura atrazinei cu izotopul ^{14}C . Sușa AK-YN10 a mineralizat doar catenele laterale din structura atrazinei (figura 5B). În urma mineralizării, s-a format rapid $^{14}\text{CO}_2$ atingând o mineralizare maximă de aproximativ 62% din atrazina marcată cu ^{14}C adaugată inițial, după 5 zile de incubare (Sagarkar et al., 2016).

De asemenea, sușa AK-YN10 are capacitatea de a degrada și utiliza ca sursă de azot și alte pesticide din clasa s-triazinelor. Parametrii cinetici de creștere au fost estimați și sunt prezentați în tabelul 2. Nu a fost observată nici o creștere atunci când s-triazinele au fost utilizate ca sursă unică de carbon. Tulpina AK-YN10 este capabilă să degradeze rapid simazina, ametronul și prometronul cu o rată de degradare ridicată (peste 70%/zi) în timp ce ametrina, prometrina și terbutilazina au fost degradate mai lent (sub 50%/zi). O rată maximă de creștere (aproximativ 0,28 DO/zi) a fost observată în cazul ametronului (Sagarkar et al., 2016).

Tabel 2. Timpul de înjumătățire a s-triazinelor și rata de degradare obținute de cultura bacteriană de AK-YN10. Rata de creștere a tulpinii AK-YN10 pe mediu mineral suplimentat cu s-triazine (unica sursă de azot) (Sagarkar et al., 2016)

s-triazine	Timp de înjumătățire f(TD₅₀) (ore)*	Rata de degradare (%/zi)	Rata de creștere (%/zi)
Atrazina	9,44±0,07	35,58±0,36	0,23±0,01
Ametrin	44,80±3,66	25,50±5,07	0,18±0,05
Prometrin	23,68±2,22	29,16±1,75	0,16±0,12
Simazin	10,06±1,47	81,85±3,71	0,15±0,05
Terbutilazină	39,12±2,35	15,66±5,50	-
Ametron	13,52±4,99	76,33±6,80	0,28±0,05
Prometron	13,36±4,66	78,76±11,93	0,21±0,06

*Valorile medii ± deviația standard. F(TD₅₀) este timpul necesar de degradare a 50% din substrat

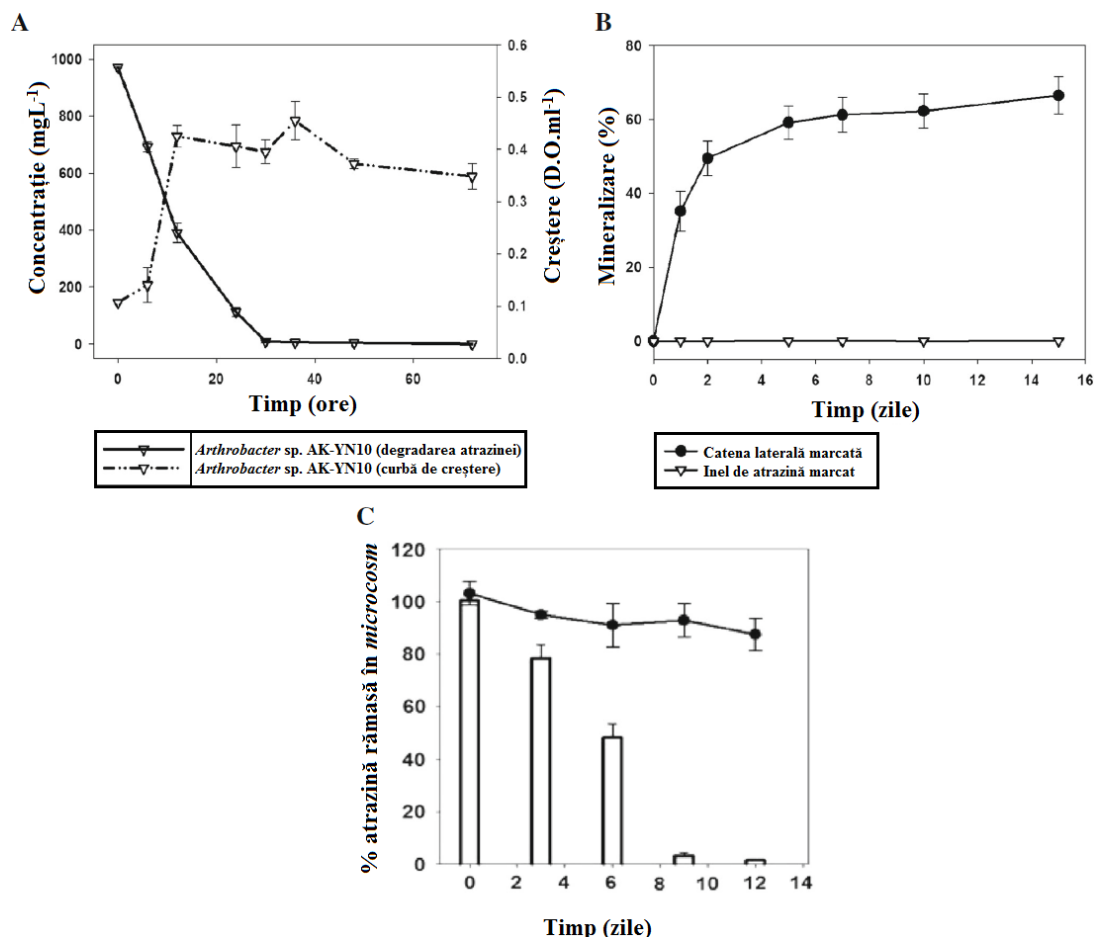


Figura 5. Utilizarea atrazinei în diferite condiții de către izolatul bacterian AK-YN10. A) Consumul atrazinei și cinetica creșterii tulpinii AK-YN10 (1000 mg L⁻¹ de atrazină a fost utilizată ca unica sursă de azot). B) Mineralizarea atrazinei marcată radioactiv (¹⁴C-Catena laterală și ¹⁴C-Inelul aromatic) utilizând AK-YN10. Sunt prezentate valorile medii cumulate ale ¹⁴CO₂ format din ¹⁴C-atrazină. În cazul A și B, barele verticale indică deviația standard. C) Evaluarea potențialului de bioremediere a izolatului AK-YN10 într-un *microcosm* cu 100 mg kg⁻¹ atrazină. Barele verticale indică procentul de atrazină rămas în microecosistemul inoculat, iar graficul liniar indică procentul de atrazină rămas în control (atenuare naturală) (Sagarkar et al., 2016)

Potențialul de bioremediere al izolatului AK-YN10 a fost evidențiat utilizându-se un microecosistem (*microcosm*) experimental ce conține sol contaminat cu atrazină. Utilizarea atrazinei în condiții de bioaugmentare (sol inoculat) a fost comparată cu capacitatea degradativă a mediului (atenuare naturală - control).

În figura 5C, este demonstrată eficiența izolatului bacterian AK-YN10 în îmbunătățirea bioremedierii solului contaminat. Atrazina din solul microecosistemului bioaugmentat cu AK-YN10 a fost complet epuizată în 12 zile, iar în control, atrazina a fost slab disipată (Sagarkar et al., 2016)

II. GENOMUL TULPINII *ARTHROBACTER* SP. AK-YN10

Într-un studiu recent (Sagarkar et al., 2014) a fost raportată schița secvenței genomice a unui izolat bacterian capabil să degradeze erbicidul atrazină - *Arthrobacter* sp. AK-YN10. Tulpina a fost izolată dintr-un sol agricol indian pe care a fost cultivată trestie de zahăr și care a fost tratat intens în ultimii trei ani cu atrazină.

II.1. Caracteristici generale ale genomului tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10

Genomul tulpinii AK-YN10 a fost secvențiat prin metoda de secvențiere de nouă generație (NGS) utilizând platforma Illumina MiSeq20. Bibliotecile de ampliconi au fost preparate prin utilizarea kit-ului Illumina Nextera DNA Library Preparation Kit și apoi secvențiate la ambele capete (*paired-end*). Bibliotecile de ampliconi au fost ulterior încărcate pe chip-uri și analizate cu instrumentul Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Genomul a fost secvențiat de două ori, creându-se astfel două versiuni diferite ale schiței genomului (V1 și V2), ce au fost ulterior depuse în baza de date NCBI (Sagarkar et al., 2016).

Pentru V1, s-a folosit kit-ul Fast DNATM Spin Kit pentru izolarea ADN-ului total din celulele de AK-YN10, iar pentru V2, a fost aplicat un protocol de izolare a plasmizilor de dimensiuni mari descris de Anderson și McKay în 1983. Secvențele scurte cu lungimea de minim 50 pb obținute în urma secvențierii au fost prelucrate utilizându-se algoritmul Trimmomatic și asamblate cu programul GS Assamblar V 2.6. Pentru asamblarea V1, s-a folosit ca referință genomul speciilor de *Arthrobacter* rezultând un grad de acoperire de 36x, în timp ce V2 a fost asamblată *de novo*.

Pentru adnotarea celor două versiuni, s-au folosit serverele NCBI PGAAP (*engl. Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) și RAST (*engl. Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz et al., 2008). Prin utilizarea serverului CG View versiunea 1.0, a fost generată o hartă circulară a genomului tulpinii AK-YN10 și comparată cu harta genomului complet al tulpinii *A. aurescens* TC1 (Sagarkar et al., 2016).

Structurile asamblate au fost folosite pentru identificarea presupuselor secvențe de codificare. Aceste secvențe au fost adnotate cu ajutorul programelor BLASTX și BLASTN (Sagarkar et al., 2016). Aceste programe compară o secvență de interes (aminoacizi sau nucleotide) cu o bibliotecă de secvențe dintr-o bază de date (NCBI în cazul nostru). Prin identificarea în baza de date a secvențelor cunoscute care prezintă un grad de similaritate cu secvența de interes, poate fi precizată funcția acesteia din urmă (Mihășan și colab., 2012).

Conform primei versiuni secvențiate, genomul are dimensiunea de aproximativ 4,84 Mb și este distribuit în 107 *contig*-uri ce conțin 4578 de presupuse secvențe de codificare (CDS). Un *contig* este un set de clone suprapuse (cu secvențe suprapuse de nucleotide) care permit întocmirea hărții fizice a unei regiuni dintr-un cromozom (Popescu, 2012). Au fost adnotate 4634 de gene codificatoare de proteine și 55 ce codifică ARN, iar conținutul mediu de G+C a fost de 63,3% (Sagarkar et al., 2014). S-a demonstrat că secvența genei ARNr 16S (1487 pb) a tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10 este similară în proporție de 98% cu cea a speciilor *Arthrobacter aureescens* TC1 și *Arthrobacter* sp. Rue61 (Mongodin et al., 2006; Sagarkar et al., 2016). În această versiune, au mai fost adnotate gene ce conferă rezistență la antibiotice și anumite metale, gene cu rol în codificarea unor dioxigenaze și monooxigenaze și elemente genetice cu rol în mobilitate. Prin utilizarea serverului RAST, au fost adnotate 552 de gene care sunt implicate în metabolismul carbohidraților (Sagarkar et al., 2014).

A doua versiune a schiței genomului are dimensiunea de 4,4 Mb și este distribuită în 464 de *contig*-uri cu 4020 de CDS, dintre care 1437 sunt presupuse proteine. Prin hibridizarea Southern blot au fost identificați cel puțin patru plasmizi (Sagarkar et al., 2016).

Secvența *shotgun* a întregului genom al tulpinii AK-YN10 a fost depusă în GenBank având indicativul NZ_AVPD00000000 împreună cu cele două versiuni: AVPD01000000 și AVPD02000000 (Sagarkar et al., 2016).

II.2. Gene implicate în metabolismul atrazinei în *Arthrobacter* sp. AK-YN10

În anul 2016, Sagarkar și colab. au izolat și caracterizat tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10 care are capacitatea de a degrada erbicidul atrazină în condiții de laborator. Izolatul AK-YN10 conține o combinație de gene *trzN-atzBC* pentru transformarea atrazinei în acid cianuric.

Calea de degradare a atrazinei debutează cu dehalogenarea compusului și formarea hidroxiatrazinei. Această reacție este catalizată de triazin-hidrolaza, enzimă codificată de gena *trzN*. Gena *trzN* a fost identificată în V2 și localizată pe *contig*-ul 12 de 30951 pb și are o secvență de 2984 pb identică cu plasmidul TC1 (figura 6). Secvența de aminoacizi a enzimei triazin-hidrolaza, codificată de gena *trzN* a tulpinii AK-YN10, a fost comparată cu secvențele complete ale triazin-hidrolazelor din baza de date NCBI. Rezultatele au indicat existența unor variații în secvența de interes și anume: în poziția 299 se găsește alanina în locul prolinei, în poziția 67, fenilalanina ia locul tirozinei, iar în poziția 117, se găsește glutamină în locul acidului glutamic (Sagarkar et al., 2016).

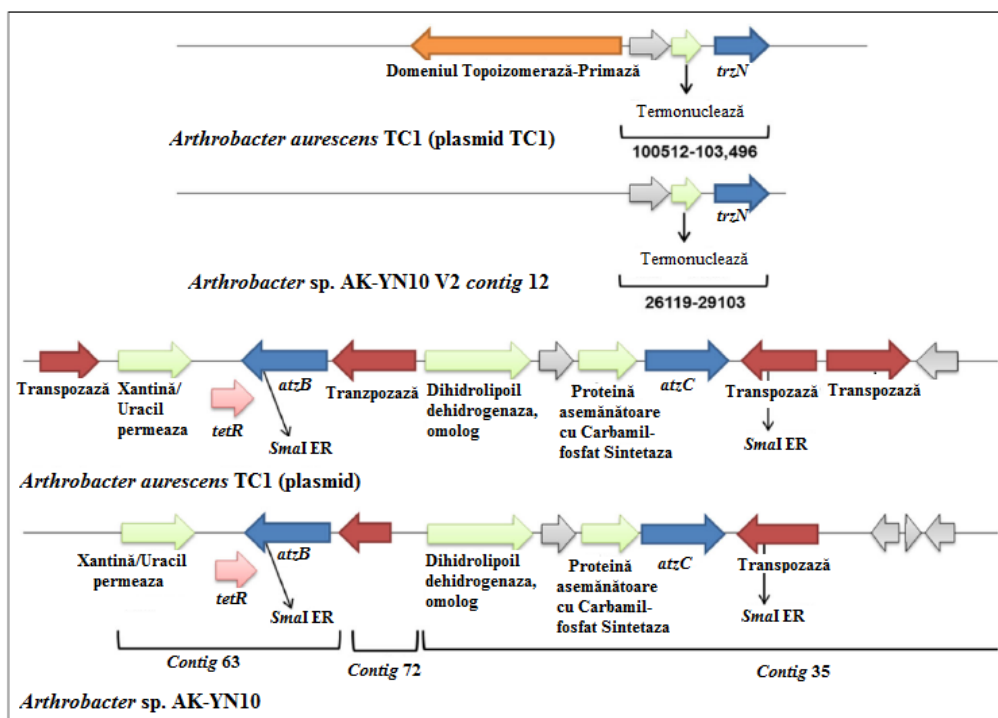


Figura 6. Organizarea și compararea genelor implicate în realizarea căii de degradare a atrazinei în AK-YN10 și în plasmidul TC1 al speciei *A. aureescens* TC1. Analizele au fost realizate cu serverul RAST. Gena *trzN* a fost identificată în V2 a schiței genomice pe *contig* 12, în timp ce *atzB* și *atzC* au fost identificate în V1 și, prin urmare, sunt afișate separat. Presupusele proteinele sunt indicate cu culoarea gri (Sagarkar et al., 2016)

Hidroxiatrazina astfel formată este transformată mai departe în acid cianuric cu ajutorul enzimelor produse de genele *atzB* și *atzC* și anume hidroxiatrazin-etilaminohidrolaza respectiv N-izopropilamelid izopropilaminohidrolaza. Aceste gene sunt omoloage cu genele *atzB* și *atzC* de pe plasmidul TC1 al speciei *A. aureescens* TC1, iar enzimele codificate de acestea au secvența de aminoacizi identică cu aceleași enzime de pe TC1. Genele *atzB* și *atzC* au fost identificate în V1 și sunt prezente pe *contig*-urile 63, respectiv 35. Analiza Southern blot a indicat că genele *atzB* și *atzC* sunt amplasate pe un singur fragment de 7,3 kb. Pentru explicarea acestei discrepanțe, Sagarkar și colab. (2016) au emis o ipoteză conform căreia *contig*-urile 63 și 35 ar putea fi separate printr-un transpozon ca și în cazul aranjării genelor *atzB* și *atzC* pe plasmidul TC1 (figura 6) subliniind astfel dificultatea asamblării genomului în prezența secvențelor de inserție bogate în secvențe repetitive. Gena *atzC* a fost localizată pe un *contig* de 37732 kb din care 42% prezintă omologie și o similaritate de 92% față de plasmidul TC1, iar jumătate din acest *contig* nu a corespuns cu secvențele din baza de date. Acest lucru sugerează faptul că fragmentul care conține genele *atzB* și *atzC* a fost obținut prin transfer orizontal de gene.

Prin tehnica Southern blot, a fost identificată prezența genelor implicate în degradarea atrazinei pe un plasmid de aproximativ 113 kb (Sagarkar et al., 2016).

Secvențele nucleotidice ale genelor *atzB*, *atzC*, *trzN* și ARNr 16S au fost depozitate în GenBank cu numerele de acces HE716866, HE716867, HE716868 și respectiv HE716859.

II.3. Gene implicate în mobilitate

Un operon flagelar a fost identificat în schița genomului tulpinii AK-YN10. Mobilitatea este o trăsătură importantă pentru un microorganism care poate fi implicat în procesul de bioremediere. După cum se poate observa în figura 7, operonul complet pentru genele implicate în codificarea flagelilor este localizat pe *contig*-ul 22, cu o secvență similară de 60-90% cu operonul flagelar al speciei *Arthrobacter chlorophenolicus* (CP001341) (Sagarkar et al., 2016).

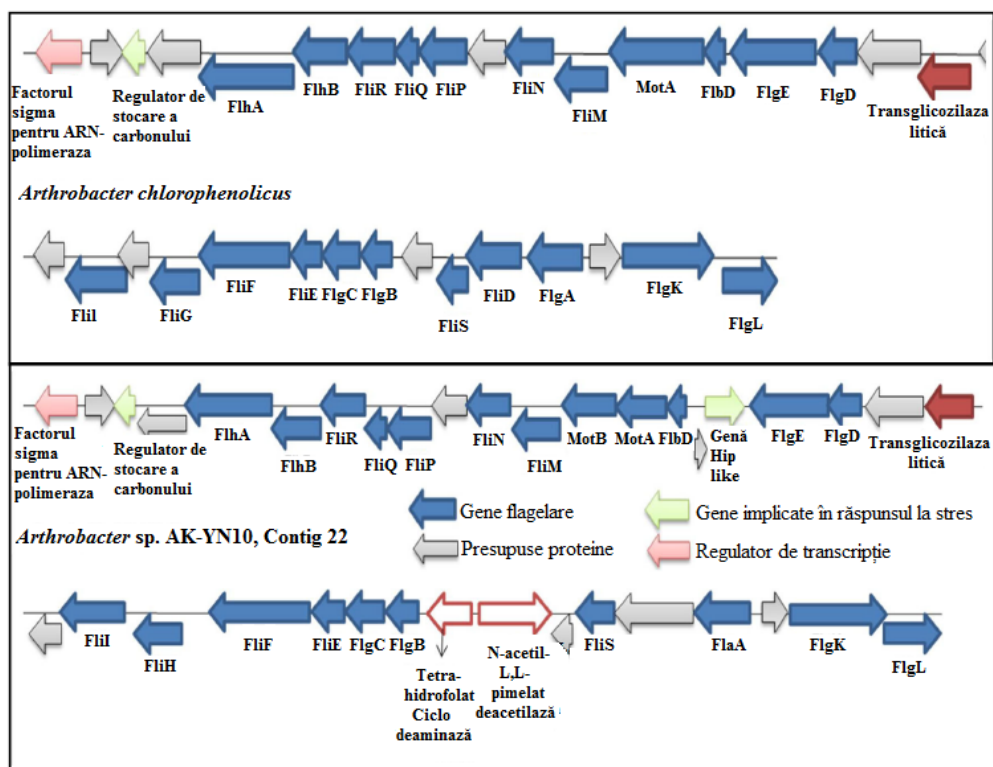


Figura 7. Organizarea și compararea genelor flagelare funcționale ale speciei *Arthrobacter chlorophenolicus* (CP001341) cu cele ale tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10, *contig* 22 (Sagarkar et al., 2016)

II.4. *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

Potrivit primei versiuni, genomul de 4,84 Mb a fost distribuit în 107 *contig*-uri. Distribuția acestora în plasmizi și cromozom este evidențiată în figura 8. Aproximativ 4.2 Mb

din genomul tulpinii AK-YN10, ce reprezintă aproape 87% din toate secvențele, este similar în proporție de 80-90% cu genomul complet al tulpinii *A. aureescens* TC1, iar restul de 13%, prezintă omologie față de diferiți plasmizi: două regiuni de aproximativ 94 și 31,5 kb prezintă o similaritate de peste 90% față de plasmidul pAO1 din *A. nicotinovorans* și respectiv plasmidul TC1 din *A. aureescens*, o regiune de 248 kb este similară în proporție de 85% dar cu o acoperire mai mică de 20% față de plasmidul TC2 al speciei *A. aureescens* și o regiune de 195 kb ce codifică proteine (Sagarkar et al., 2016).

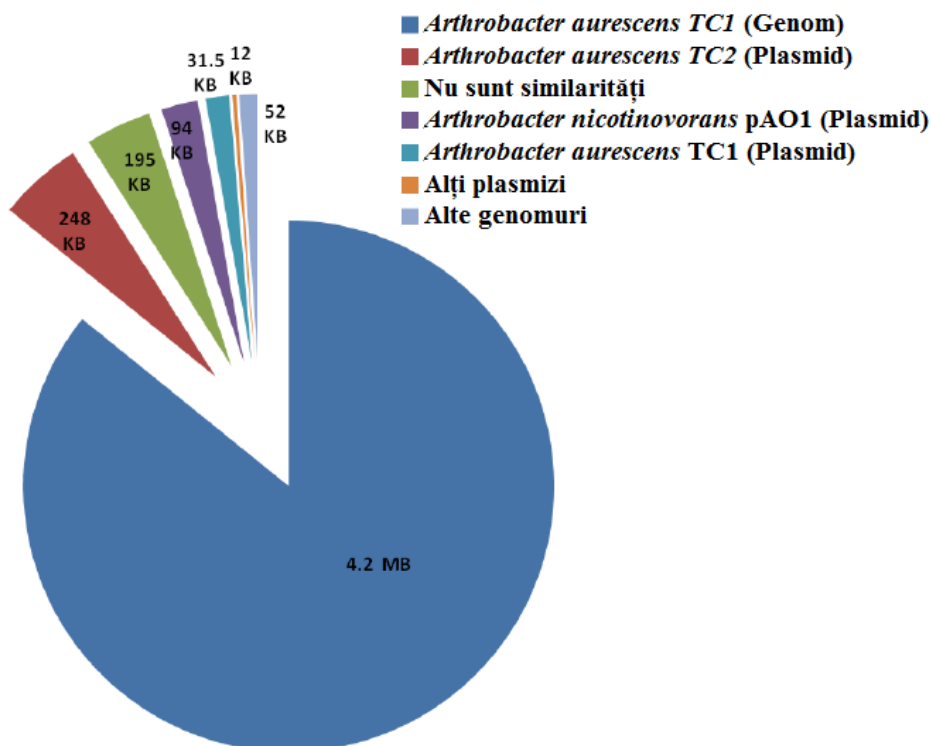


Figura 8. Distribuția *contig*-urilor tulpinii AK-YN10 în plasmid și cromozom analizată utilizându-se programul de căutare BLAST. Secvențele nucleotidice utilizate ca referință aparțin unor specii din genul *Arthrobacter* (Sagarkar et al., 2016)

În tulpina AK-YN10, pe lângă plasmidul care conține genele implicate în realizarea căii de degradare a atrazinei, au mai fost identificați alți trei plasmizi. Prin secvențierea totală a genomului tulpinii AK-YN10 și cu ajutorul programului BLAST, a fost identificată o regiune de aproximativ 94 kb ce prezintă o similaritate de peste 90% față de plasmidul pAO1 ce aparține speciei *Arthrobacter nicotinovorans*. Această regiune este compusă din zece *contig*-uri (tabel 3) dintre care șase sunt foarte similare (peste 90%) și patru prezintă o similaritate redusă (sub 70%) față de plasmidul pAO1 (Sagarkar et al., 2016).

Tabel 3. Compararea unor *contig*-uri din tulpina AK-YN10 cu plasmidul pAO1 din *A. nicotinovorans* (Sagarkar et al., 2016)

Număr <i>contig</i>	Descriere	Acoperire (%)	Identitate (%)
<i>Contig</i> 39	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , plasmidul pAO1	72	99
<i>Contig</i> 43		100	99
<i>Contig</i> 47		51	98
<i>Contig</i> 50		36	87
<i>Contig</i> 52		100	99
<i>Contig</i> 54		67	97
<i>Contig</i> 66		100	99
<i>Contig</i> 73		100	99
<i>Contig</i> 75		100	99
<i>Contig</i> 91		99	91

Mai mult decât atât, secvențele nucleotidice ale ADN-ului plasmidic extras din genomul tulpinii AK-YN10 au fost aliniat prin programul MAUVE cu secvențele plasmidului pAO1 al speciei *A. nicotinovorans* (figura 9).

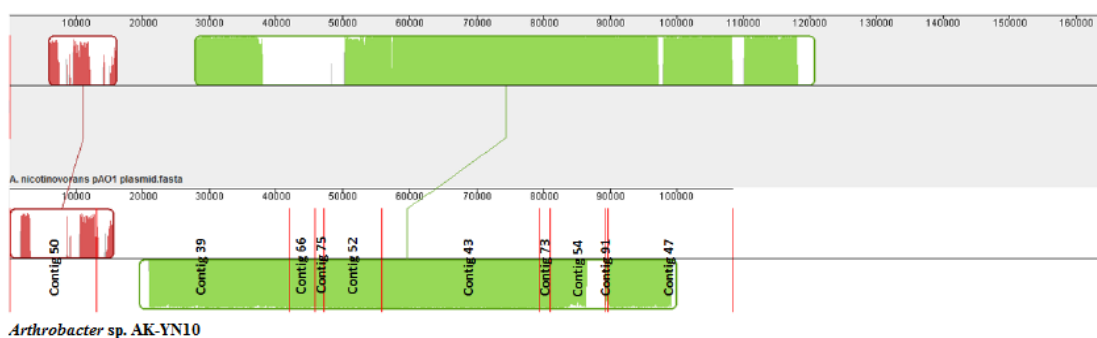


Figura 9. Alinierea progresivă între plasmidul pAO1 al speciei *A. nicotinovorans* și zece *contig*-uri ale tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10. Alinierea a fost realizată cu programul MAUVE (Sagarkar et al., 2016)

Pe baza acestor informații și din datele obținute în urma secvențierii a fost reconstituit un fragment de aproximativ 108 kb. Prin adnotarea acestui fragment, a fost identificată prezența unei gene ce codifică enzima 6-hidroxi-D-nicotin-oxidaza care este implicată în calea de degradare a nicotinei precum și diferite cadre deschise de citire (*engl.* **O**pen **R**eadin**G** **F**rame - ORF) (Sagarkar et al., 2016).

În articolul publicat de Mihășan și Brandsch în 2013 a fost constatată absența genelor implicate în realizarea căii de degradare a nicotinei (genele *nic*) în cadrul genul *Arthrobacter* cu excepția tulpinii *A. nicotinovorans* pAO1. Între anii 2013-2016, în urma unor proiecte de secvențiere, au fost identificate și introduse în bazele de date genomuri noi ale unor tulpini de *Arthrobacter*, și s-a dovedit că acestea conțin grupul (*cluster*-ul) de gene *nic* complet sau incomplet (Mihășan, 2016).

În baza de date GenBank se găsesc 25 de intrări pentru plasmizi din genul *Arthrobacter* dintre care niciunul nu este similar cu plasmidul pAO1. Până în prezent, în aceeași bază de date sunt depozitate 37 de intrări pentru genomuri din genul *Arthrobacter*: 5 genomuri complete și adnotate, 10 schițe complete (un set de *contig*-uri) și 22 de genomuri incomplete. Recent, s-a constatat că secvențele plasmidul pAO1 prezintă un grad ridicat de similaritate în regiunea genelor *nic* față de trei schițe genomice ale unor tulpini noi din genul *Arthrobacter*: M2012083 (NZ_AKKK000000000), SJCon (NZ_AOFD000000000) și AK-YN10 (NZ_AVPD000000000) (figura 10). Folosind programul MAUVE, cele trei schițe au fost asamblate utilizându-se ca matriță 5 genomuri complete de *Arthrobacter* din GenBank: *A. aurescens* TC1 (NC_008711), *A. chlorophenolicus* A6 (NC_011886), *A. arilaitensis* Re117 (NC_014550), *A. phenanthrenivorans* Sphe3 (NC_015145) și *A. nitroguajacolicus* Rue61a (NC_018531) (Mihășan, 2016). Genomurile asamblate au fost adnotate prin RAST (Aziz et al., 2008) și aliniat cu Artemis (Carver et al., 2005).

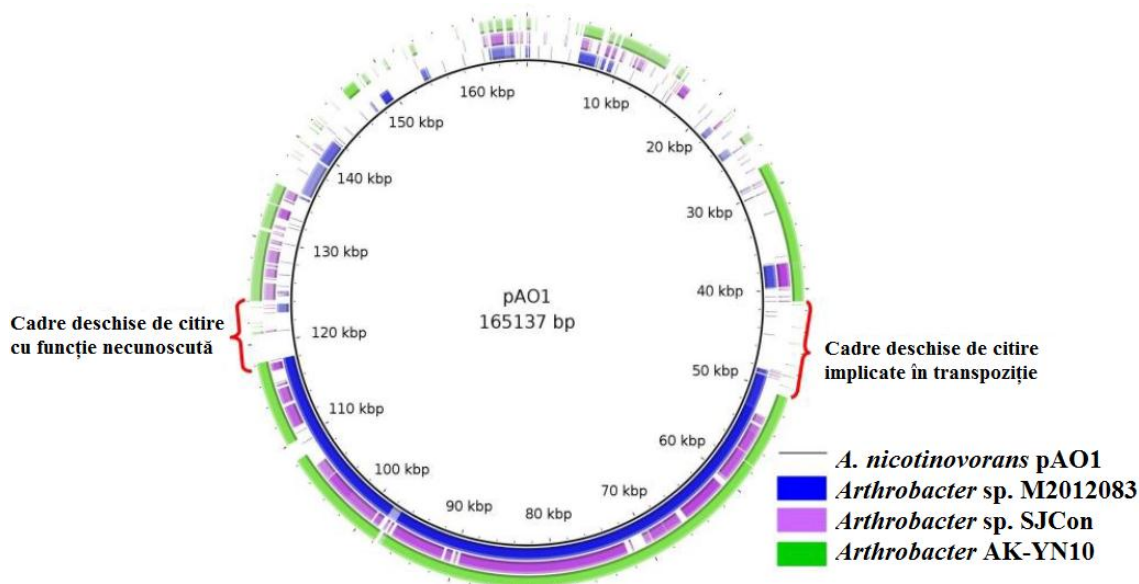


Figura 10. Similaritatea secvențelor între plasmidul pAO1 și alte tulpini de *Arthrobacter*. Regiunea similară conține genele *nic* și este flancată de două regiuni ce conțin la rândul lor presupuse cadre deschise de citire. Imaginea a fost generată prin BRIG (*engl.* BLAST Ring Image Generator) (Alikhan et al., 2011)

În figura 11 poate fi observată comparația completă între modul de aranjare a genelor *nic* pe plasmidul pAO1 și în cele trei tulpini de *Arthrobacter*. Grupul de gene *nic* poate fi împărțit în cinci module, fiecare modul codificând o etapă precisă în calea de degradare a nicotinei. Modulele de pe plasmidul pAO1 sunt cele mai complexe având un număr mare de gene, inclusiv gene pentru transpozaze și elemente de inserție, în timp ce modulele tulpinii *Arthrobacter* sp. SJCon sunt cele mai simple, cu un număr mic de cadre deschise de citire și cu regiuni mari necodificatoare (Mihășan, 2016).

În cazul tulpinii *Arthrobacter* sp. AK-YN10, cele cinci module sunt răspândite în întregul genom. Rezistența la nicotină a acestei sușe este similară cu cea a tulpinii *A. nicotinovorans* pAO1 (6 g/L) fiind mai ridicată decât a altor specii precum *Pseudomonas* sp HF-1 (1,5 g/L), *Pseudomonas* sp. Y22 (3g/L), *Pseudomonas geniculata* (4 g/L) sau *Shinella* sp. H2N7 (5 g/L). Mai mult decât atât, AK-YN10 se poate dezvolta pe mediu citrat suplimentat cu nicotină. Dezvoltarea acestei sușe este însoțită de o scădere lentă a concentrației de nicotină din mediu fără să se formeze pigmentul albastru caracteristic pentru degradarea nicotinei (Mihășan, 2016).

Metoda MAUVE a fost folosită pentru asamblarea unor genomuri țintă (cele 3 schițe) utilizându-se ca matrițe genomurile unor specii apropiate din punct de vedere evolutiv (5 genomuri complete din GenBank) obținându-se astfel 5 genomuri asamblate pentru fiecare schiță. În cazul fiecărui genom asamblat al tulpinii AK-YN10, genele *nic* au fost localizate la un capăt extrem al genomului fiind izolate de celelalte gene. Pe baza acestor constatări, s-a emis o ipoteză conform căreia genele *nic* ar putea fi localizate pe un plasmid, ca și în cazul speciei *A. nicotinovorans* (Mihășan, 2016).

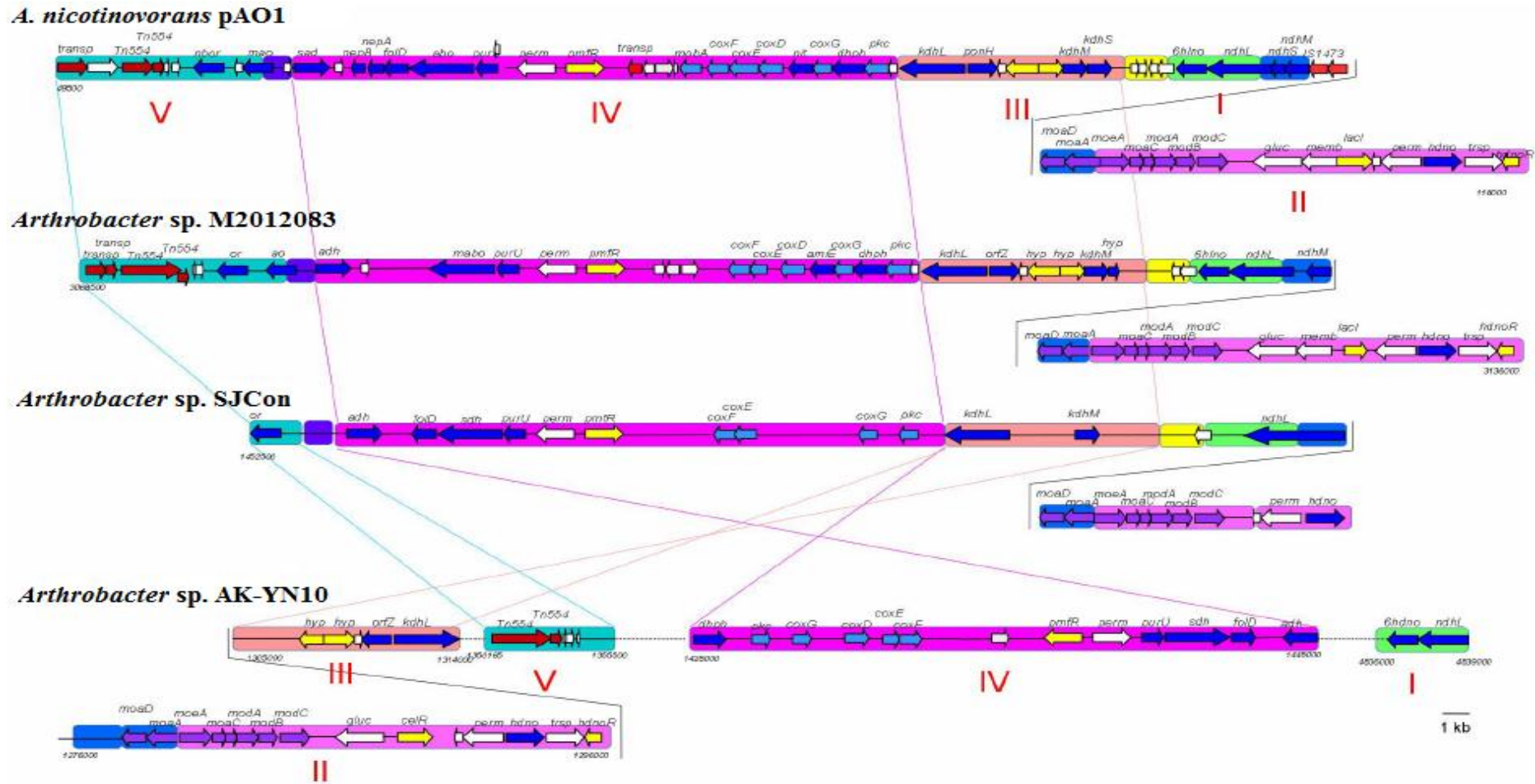


Figura 11. Coliniaritatea genelor *nic* în genomuri de *Arthrobacter*. Săgețile roșii indică cadrele deschise de citire implicate în transpoziție; Săgețile albastre indică genele *nic*; Săgețile galbene indică regulatorii de transcriere; Săgețile purpurii indică cadrele deschise de citire implicate în biosinteza cofactorilor. Imaginea a fost realizată prin MAUVE cu parametri prestabiliți (Mihășan, 2016)

III. MATERIALE ȘI METODE

III.1. Tulpini utilizate și condiții de cultivare

III.1.1. Tulpinile utilizate

Tulpinile de microorganisme, plasmidele și substanțele chimice folosite în acest studiu sunt:

1. *Arthrobacter* sp. AK-YN10, sușă primită cadou din partea Dr. Atya Kapley (Institutul Național de Cercetare și Inginerie a Mediului, CSIR-NEERI, Nagpur, India)
2. *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 (ATCC 49919), tulpină primită cadou din partea Prof. Dr. Roderich Brandsch (Institutul de Biochimie și Biologie Moleculară, Universitatea Albert-Ludwigs din Freiburg, Germania)
3. Soluție stoc de canamicină 70 μg/ml (Sigma-Aldrich, Germania): pentru prepararea unui volum de 60 ml soluție canamicină 35 μg/ml, 30 ml din soluția stoc se aduc la un volum final de 60 ml cu apă distilată. Soluția se sterilizează prin filtrare folosind filtre de 0,22 μm (Carl Roth, Germania). După filtrarea soluției stoc, aceasta se diluează după necesități cu apă distilată sterilă;
4. Extract de drojdie (Merck, Germania);
5. Nicotină (Sigma-Aldrich, Germania);
6. Mediu citrat lichid, preparat după cum urmează:

În 400 ml apă distilată se dizolvă pe rând:

- 2 g $C_6H_3O_7Na_3$ (Chemical Company, România);
- 2 g $(NH_4)_2SO_4$ (Reactivul București, România);
- 4,92 g Na_2HPO_4 (Reactivul București, România);
- 3,06 g KH_2PO_4 (Reactivul București, România);

Se aduce la 950 ml cu apă distilată după care se sterilizează timp de 20 minute la 125°C, 2 atm. Pentru prepararea mediului citrat solid, se adaugă și agar 15 g/L;

7. Soluție de minerale (Eberwein et al., 1961) preparată astfel:

În 700 ml de apă distilată se dizolvă:

- 0,75 g $CaCl_2$;
- 4,58 g H_3BO_3 ;
- 3,5 g $ZnSO_4$;
- 0,22 g Na_2MoO_4 ;

- 0,22 g FeSO₄;
- 0,24 g MnSO₄;
- 0,1 g CuSO₄;
- 0,1 g CoSO₄;
- 2 g KH₂PO₄;
- 2 g MgSO₄;
- 7,5 g Acid etilendiaminotetraacetic (EDTA);

Se aduce la 1 L cu apă distilată. După preparare, soluția se sterilizează prin filtrare folosind filtre de 0,22 μm (Carl Roth, Germania) și se păstrează la 4°C.

8. Boxă cu flux de aer laminar, clasă biologică 2, EBSCO;
9. Incubator cu agitare GFL 3031.

III.1.2. Condiții de cultivare

Tulpinile de *A. nicotinovorans* pAO1 și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 au fost păstrate un timp îndelungat în congelator la o temperatură de -80°C. Pentru reactivarea acestor tulpini bacteriene, s-au scos eprubetele de criostocare din congelator și cu ajutorul unei anse, o parte din conținutul acestora a fost prelevat și folosit pentru inocularea unei plăci Petri cu mediu citrat solid. După utilizare, eprubetele de criostocare au fost introduse imediat în congelator deoarece ciclurile dezgheț-îngheț afectează viabilitatea celulelor.

Sușele bacteriene au fost cultivate pe plăci Petri cu mediu citrat solid în vederea obținerii unor colonii izolate. Mediul a fost suplimentat cu canamicină 35 μg/ml, nicotină 0,05% și soluție de minerale 5%. Canamicina este utilizată în scopul prevenirii dezvoltării altor bacterii. Plăcile însămânțate cu cele două sușe au fost incubate timp de 48 de ore la temperatura de 28°C.

Pentru cultivarea în mediu citrat lichid, a fost inițiată mai întâi o precultură prin inocularea a 10 ml de mediu citrat lichid suplimentat cu extract de drojdie, soluție de minerale (5%), canamicină (35 μg/ml) și nicotină (0,05%) cu câte o colonie de pe placa cu *A. nicotinovorans* pAO1 și respectiv AK-YN10. Preculturile au fost ulterior incubate peste noapte pe un agitator termostatat la 190 rpm și la temperatura de 28°C. Pe parcursul nopții, precultura ajunge în faza staționară și numărul celulelor atinge valoarea maximă, rămânând constant. Prin urmare, culturile propriu-zise obținute prin inocularea cu un volum fix de precultură vor fi identice din punct de vedere al numărului inițial de celule precum și al vârstei acestora.

Culturile propriu-zise au fost înființate prin inocularea a 10 ml de mediu citrat lichid cu un volum de 100 μ l de precultură (diluție 1:100 a inoculului). Culturile au fost incubate pentru 48 de ore pe un agitator termostatat la 190 rpm și la temperatura de 28°C.

III.1.3. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate

Metoda de colorație Gram, introdusă în bacteriologie de Christian Gram în 1884 și completată ulterior, a permis gruparea bacteriilor în: Gram pozitive, Gram negative și Gram variabile. Bacteriile care rezistă la decolorarea cu alcool-acetonă sunt numite Gram-pozitive și apar colorate în violet. Bacteriile care decolorează sub acțiunea alcool-acetonei și se recolorează cu fucsină fenicată diluată 1/10, sunt numite Gram-negative și apar colorate în roșu. Bacteriile Gram-variabile pot fi atât Gram-pozitive cât și Gram-negative (Dunca et al., 2007).

Materiale necesare:

- Cultura microbiană de *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *A. nicotinovorans* pAO1;
- Soluție apoasă de violet de metil 0,2%;
- Soluție Lugol;
- Soluție alcool-acetonă 9:1;
- Soluție fucsină Ziehl diluată 1/10;
- Lame de sticlă curate și bine degresate – Degresarea se face prin păstrarea lamelor în cristalizoare cu alcool. În momentul utilizării, lamele se șterg cu tifon apoi se flambează la flacăra becului de gaz;
- Microscop confocal Leica TCS SPE DM 5500Q, cu cameră DFC-290, soft - LAS (Leica Application Suite-versiune 2.8.1.) (Leica Microsystems);

Mod de lucru:

Efectuarea frotiului cuprinde patru timpi: etalarea, uscarea, fixarea și colorarea.

1. Etalarea – în centrul lamei s-a depus o picătură din cultura microbiană în mediu lichid de *A. nicotinovorans* pAO1 și AK-YN10 și s-a etalat în așa fel încât să se obțină un strat subțire și uniform, pe o suprafață de aproximativ 2 cm²;
2. Uscarea – frotiul astfel executat s-a lăsat la uscat la temperatura camerei;

3. Fixarea prin căldură s-a făcut trecând lama de câteva ori, cu frotiul în sus, prin flacăra becului de gaz. Pentru a preveni modificări ale structurilor celulelor bacteriene, fixarea nu a durat mai mult de 5-10 secunde, iar temperatura nu a fost prea ridicată;
- Colorația Gram cuprinde patru timpi: colorarea, mordansarea, decolorarea și recolorarea.
4. Colorarea – frotiul uscat și fixat s-a acoperit cu soluție apoasă de violet de metil 0,2%. Soluția s-a menținut 1-2 minute și apoi s-a vărsat. Frotiul s-a spălat cu apă de robinet;
 5. Mordansarea – frotiul s-a acoperit cu soluție Lugol și s-a menținut 4-5 minute, fără a se spăla cu apă;
 6. Decolorarea – frotiul s-a înclinat și s-a acoperit cu soluție alcool-acetonă 9:1. Acțiunea decolorantului a fost oprită prin spălare cu apă de robinet;
 7. Recolorarea – s-a acoperit frotiul cu fucsină diluată 1/10. Colorantul s-a menținut 1-2 minute, după care frotiul s-a spălat cu apă, s-a uscat și s-a examinat la microscopul cu imersie.

III.2. Izolarea ADN-ului plasmidial

Pentru izolarea ADN-ului plasmidial trebuie depășită o problemă destul de dificilă reprezentată de separarea plasmidelor de alte molecule de aceeași natură (ADN-cromozomial). Radloff și colab. au reușit în 1967 să izoleze pentru prima dată ADN-plasmidial folosind o metodă care se bazează pe absorbția diferențiată a bromurii de etidiu. De atunci au fost descrise diverse alte metode, ce se bazează pe gel-filtrare, cromatografie cu schimbători de ioni sau precipitare diferențiată (Sambrook, 2001). Dintre acestea, cele mai utilizate metode, datorită simplității și randamentului mare, sunt cele ce folosesc precipitarea diferențiată. Aceste metode se bazează pe proprietatea ADN-ului plasmidial de a se renatura mult mai rapid decât ADN-ul genomic, acesta din urmă fiind precipitat împreună cu moleculele proteice. Două metode de izolare a ADN-ului plasmidial au devenit clasice în biologia moleculară: liza alcalină (Birnboim și Doly, 1979) și liza prin fierbere (Holmes și Quigley, 1981). Pentru plasmide de dimensiuni mari (peste la 10 kb), se folosesc metode mai puțin invazive, precum centrifugarea în gradient de CsCl (Sambrook et al., 1989).

III.2.1. Izolarea ADN-ului plasmidial prin metoda lizei alcaline

Metoda a fost descrisă pentru prima dată de Birnboim și Doly în anul 1979 și constă în două etape distincte: liza celulară și precipitarea selectivă a ADN-ului plasmidial, urmată de precipitarea ADN-ului cu solvenți organici (subcapitolul III.2.3.).

În prima etapă, celulele bacteriene sunt lizate în condiții de alcalinitate prin acțiunea NaOH care determină denaturarea ADN-ului și a SDS-ului care rupe membranele celulare și denaturează proteinele în vederea eliberării conținutului celular. Precipitarea selectivă a ADN-ului plasmidial se bazează pe faptul că plasmidele au dimensiuni mici și sunt puternic supra-spiralizate, pe când ADN-ul genomic are dimensiuni mari și este mai puțin răsucit. Această diferență de topologie permite precipitarea selectivă a ADN-ului genomic împreună cu proteinele, ADN-ul plasmidial și ARN-ul rămânând în soluție (Mihășan et al., 2012).

III.2.1.1. Liza celulară și denaturarea ADN-ului

Liza celulelor a fost realizată cu scopul eliberării acizilor nucleici prin acțiunea combinată a detergenților și a enzimelor litice. Detergenții au capacitatea de a solubiliza membranele celulare ducând la eliberarea conținutului celular. Cel mai frecvent utilizați sunt SDS (dodecil sulfat de sodiu sau lauril sulfat de sodiu), Triton X-100, și CTAB (bromură de cetil trimetil amoniu). Enzimele litice sunt în general adăugate într-o soluție tampon de liză ce conține detergenți. Lizozimul este larg utilizat pentru liza bacteriilor Gram pozitive. Proteinaza K lizează glicoproteinele și inactivează parțial nucleazele (Mihășan et al., 2012).

Materiale necesare:

- Soluție stoc TRIS 100mM (Sigma-Aldrich, Germania) – 1,21g TRIS bază se dizolvă în 100 ml apă distilată; pentru prepararea unui volum de 50 ml TRIS 50mM, 25 ml TRIS 100mM se aduc la un volum final de 50 ml cu apă distilată;
- Soluție stoc EDTA 0,5M (Sigma-Aldrich, Germania), pH 8 – se cântărește 18,6 g EDTA și se dizolvă în aproximativ 70% din volumul de apă (volum final de 100 ml); se adaugă NaOH solid până când soluția se clarifică, după care se verifică pH-ul; dacă este necesar, pH-ul se corectează cu NaOH;
- Soluție sucroză 6,7% - TRIS 50mM - EDTA 1mM, pH 8 preparată astfel: 3,35 g sucroză (Merck, Germania) se dizolvă în 25 ml TRIS 100mM și în 100 μl EDTA 0,5M pH 8 și se aduce la un volum final de 50 ml cu apă distilată; în prealabil se corectează pH-ul cu NaOH;
- Soluție SDS 20% - TRIS 50mM - EDTA 20mM, pH 8 preparată după cum urmează: 20 g SDS (Carl Roth, Germania) se dizolvă în 10 ml TRIS 100mM și în 0,8 ml EDTA 0,5M pH 8 și se aduce la un volum final de 20 ml cu apă distilată;

- Soluție de lizozim 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Germania) preparată în 2,5 ml TRIS 100mM și adus la un volum final de 10 ml cu apă distilată;
- Soluție tampon TRIS 50mM – EDTA 0,25M, pH 8 preparată astfel: într-un cilindru gradat de 100 ml se introduc 50 ml TRIS 100mM și 50 ml EDTA 0,25M, pH 8;
- Soluție TRIS 2M, pH 7 – 4,84 g TRIS se dizolvă într-un volum final de 20 ml apă distilată; pH-ul se corectează cu NaOH;
- Soluție NaOH 3N (Chemical Company, România) – 12 g NaOH se dizolvă într-un volum final de 100 ml apă distilată;
- Soluție NaCl 5M (Chemical Company, România) – 5,85 g NaCl se dizolvă într-un volum final de 20 ml apă distilată;
- Soluție proteinaza K 10 mg/ml (Merck, Germania) – 10 mg proteinază K se dizolvă în 1 ml apă distilată; soluția obținută se repartizează în microeprubete, câte 4 μ l/microeprubetă și se păstrează la temperatura de -20°C; nu se recongelează după decongelare;

Mod de lucru:

1. Culturile obținute au fost centrifugate 20 de minute la 4000 rpm. Supernatantul a fost înlăturat și depozitul celular resuspendat în 2 ml soluție TRIS 50mM, pH 8. Această etapă a fost repetată;
2. Celulele au fost resuspendate în 379 μ l soluție sucroză 6,7% - TRIS 50mM - EDTA 1mM, pH 8 fiind ulterior incubate 5 minute la 37°C;
3. Un volum de 96,5 μ l soluție de lizozim 10 mg/ml a fost adăugat și amestecul a fost apoi incubat 15 minute la 37°C;
4. S-a adăugat 48,2 μ l soluție tampon TRIS 50mM – EDTA 0,25M, pH 8;
5. A fost adăugat un volum de 27,6 μ l soluție SDS 20% - TRIS 50mM - EDTA 20mM, pH 8 și s-a amestecat rapid prin răsturnarea microeprubetelor. Lizatul obținut a fost incubat 10 minute la 37°C;
6. După incubare, microeprubetele au fost vortexate 30 de secunde, la viteză maximă;
7. A fost adăugat un volum de 27,6 μ l soluție NaOH 3N. Lizatul din microeprubete a fost amestecat prin răsturnare timp de 10 minute;
8. A fost adăugat un volum de 49,6 μ l soluție TRIS 2M, pH 7 și conținutul a fost din nou amestecat prin răsturnare timp de 3 minute;
9. A fost adăugat un volum de 71,7 μ l soluție NaCl 5M și 10 μ l soluție proteinaza K 10 mg/ml;

III.2.2. Extracția ADN-ului total

Toate metodele de extracție a ADN-ului au la bază metoda clasică de extracție cu fenol/cloroform/alcool izoamilic descrisă pentru prima dată de Chomzynski și Sacchi în anul 1987. Lizatul celular conținând acizii nucleici este pus în contact cu un amestec organic nemiscibil cu apa, alcătuit din fenol, cloroform și alcool izoamilic. Fiecare din cele 3 componente ale fazei organice are un rol bine stabilit și anume: fenolul realizează denaturarea proteinelor și solubilizarea lor parțială în faza organică; cloroformul asigură o mai bună separare între faza apoasă și cea organică reducând cantitatea de apă reținută de aceasta din urmă, iar alcoolul izoamilic preîntâmpină formarea spumei ajutând la separarea celor două faze și măbind randamentul.

Proteinele denaturate se separă la interfața dintre faza organică și faza apoasă, iar ADN-ul rămâne în cea din urmă. Ulterior, din faza apoasă, ADN-ul este izolat prin precipitare cu alcoolii (etanol, izopropanol)(Mihășan et al., 2012).

Materiale necesare:

- Soluție de fenol (Sigma-Aldrich, Germania) saturată cu NaCl 3% preparată astfel: o cantitate de 11 g de fenol a fost topită la 65°C pe baia de apă; s-au obținut 10 ml de fenol lichid peste care s-a adăugat 10 ml soluție NaCl 3%; soluția obținută a fost amestecată 15 minute și păstrată la -20°C în flacoane brune;
- Soluție cloroform/alcool izoamilic 24:1 (Chimactiv și respectiv Chemical Company, România);

Mod de lucru:

1. Peste lizat s-a adăugat un volum de 700 μl soluție fenol saturat cu NaCl și microprubetele au fost agitate energic urmând a fi centrifugate 5 minute la 4000 rpm;
2. Supernatantul, reprezentat de faza apoasă, a fost transvazat în altă microprubetă și s-a adăugat un volum de 700 μl soluție cloroform/alcool izoamilic; S-a repetat centrifugarea în aceleași condiții ca în etapa anterioară;

III.2.3. Precipitarea ADN-ului cu solvenți organici

Din supernatantul rezultat, ADN-ul este precipitat în vederea eliminării compușilor micromoleculari cu ajutorul unor solvenți organici cum ar fi izopropanolul (concentrație finală 40-50%) sau etanol (75-80%). Solvenții organici induc, în prezența unor concentrații

mari de cationi monovalenți (0,1-0,5 M), o serie de modificări structurale la nivelul moleculelor de acizi nucleici, determinând agregarea și precipitarea acestora. Deoarece majoritatea sărurilor și compușilor micromoleculari sunt solubili în etanol 70%, această etapă asigură și eliminarea moleculelor de acest tip. Izopropanolul are avantajul că poate fi utilizat în volume mici, însă prezintă și dezavantajul că sărurile au o solubilitate mai mică în acest alcool, precipitând odată cu ADN-ul (Ausubel et al., 2002).

Materiale necesare:

- Supernatantul (faza apoasă) ce conține ADN total;
- Izopropanol de puritate 99% (Chimreactiv, România);

Mod de lucru:

1. În urma centrifugării, faza superioară a fost îndepărtată, iar cea apoasă a fost precipitată cu 700 μ l izopropanol;
2. Probele au fost incubate timp de 1 oră la -20°C ;
3. Ulterior, probele au fost centrifugate 30 de minute la 14000 rpm. Supernatantul a fost îndepărtat, iar precipitatul a fost uscat la temperatura camerei urmând a fi resuspendat în 100 μ l apă distilată;

III.2.4. Separarea electroforetică a ADN-ului total

Probele de ADN total (cromozomial și plasmidial) obținute din celulele celor două tulpini au fost ulterior încărcate într-un gel de agaroză 0,75% preparat în 50 ml soluție tampon TRIS-Acid acetic-EDTA (TAE) 1X pH 8 și în care s-a adăugat 10 μ l soluție EtBr 0,5 mg/ml. În godeuri a fost încărcat un volum de 18 μ l de probă și 3 μ l de marker de masă moleculară. Electroforeza a fost realizată în soluție tampon TRIS-Acid acetic-EDTA (TAE) 1X la pH 8, iar tensiunea aplicată a fost de 120 V. Timpul de migrare a fost de aproximativ 30-40 de minute. Metoda este descrisă în detaliu în subcapitolul III.3.

III.2.5. Izolarea ADN-ului plasmidial din geluri de agaroză

Electroforeza în geluri de agaroză nu este doar o metodă de vizualizare a fragmentelor de ADN izolat, ci este, în principal, o metodă de separare a fragmentelor de ADN în funcție de dimensiuni. Pentru ca fragmentul de interes separat prin electroforeză să poată fi utilizat ulterior în alte aplicații (ligări, transformări, fosforilări) este necesară izolarea lui din gelul de agaroză și solubilizarea într-o soluție tampon convenabilă. De-a lungul timpului, au fost

dezvoltate mai multe metode de izolare a ADN-ului din geluri de agaroză, metode ce utilizează electroeluția, transferul prin electroforeză a ADN-ului din gel pe un fragment de hidroxiapatită, dizolvarea agarozei cu ajutorul iodurii de potasiu sau a agarazei (Ausubel et al., 2002; Mihășan et al., 2012). Metoda de izolare a ADN-ului plasmidial utilizată în acest studiu este bazată pe observațiile lui Vogelstein și Gillespie (1979) legate de proprietatea sticlei de a lega fragmentele de ADN.

Materiale necesare:

1. Trusă de izolare a ADN-ului din gelul de agaroză Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) dotată cu:
 - ADB (*engl.* **A**garose **D**issolving **B**uffer) - Soluție tampon pentru dizolvarea agarozei;
 - DNA Wash Buffer - Soluție tampon de spălare a ADN-ului;
 - Coloane Zymo-Spin™ I cu membrană de siliciu;
 - Microeprubete de colectare;
2. Bisturiu;
3. Incubator pentru microeprubete (Eppendorf Thermo Mixer);

Mod de lucru:

1. După terminarea separării electroforetice, gelul a fost expus la lumina ultraviolet (UV) și ADN-ul colorat cu bromură de etidiu a fost evidențiat. Din gel s-au excizat porțiunile care conțin ADN-ul plasmidial cu ajutorul unui bisturiu. Fragmentul de gel a fost plasat într-o microeprubetă cântărită în prealabil și i s-a determinat masa. Excizia a fost realizată sub lampa de UV purtând echipamentul obligatoriu (mănuși de nitril și ochelari de protecție);
2. Peste fragmentul de agaroză, s-a pipetat 3 volume de ADB (de exemplu, dacă masa gelului este 100 mg se adaugă 300 μl ADB);
3. Amestecul a fost incubat la 50°C, cu agitare până la dizolvarea agarozei;
4. Peste soluția cu agaroză dizolvată a fost adăugat un volum de apă distilată egal cu masa fragmentului de agaroză excizat. Soluția obținută a fost transferată într-o coloană Zymo-Spin™ I prevăzută cu o membrană de siliciu plasată într-o microeprubetă de colectare și s-a centrifugat 2 minute la 14000 rpm. Lichidul se aruncă, iar coloana se reintroduce în aceeași microeprubetă colectoare;

5. Membrana a fost spălată prin aplicarea a 200 μ l tampon de spălare (DNA Wash Buffer) și s-a centrifugat timp de două minute la 14000 rpm. Lichidul de spălare s-a aruncat, iar coloana s-a reintrodus în microeprubeta de colectare. Această etapă a fost repetată;
6. Coloana s-a transferat într-o microeprubetă de centrifugă, s-a adăugat 15 μ l de apă distilată și s-a incubat 2-10 minute la temperatura camerei. S-a centrifugat 2 minute la 14000 rpm;
7. ADN-ul a fost colectat în apă distilată și s-a păstrat la 4°C.

III.3. Electroforeză în geluri de agaroză

Separarea electroforetică a moleculelor de ADN este una din metodele care au stat la baza dezvoltării foarte rapide a biologiei moleculare. Tehnica permite nu numai separarea fragmentelor de ADN, ci și izolarea, evidențierea și caracterizarea acestora. Rapiditatea metodei, simplitatea aparaturii utilizate și nu în ultimul rând rezoluția deosebită au făcut ca electroforeza să înlocuiască tehnicile bazate pe ultracentrifugare în gradient de sucroză (zaharoză) încă din momentul descrierii primelor protocoale de separare de către Thorne și de evidențiere a fragmentelor de ADN de către Aaij și Sharp.

Electroforeza în gel de agaroză este utilizată pentru purificarea fragmentelor de ADN rezultate în urma digestiei enzimatică și a produșilor PCR în scopul clonării, și reprezintă de asemenea un punct de plecare pentru identificarea unor fragmente specifice de ADN prin Southern Blot sau fragmente de ARN prin Northern Blot. Având în vedere importanța metodei electroforetice în gel de agaroză, înțelegerea principiilor de bază care stau la baza acestei tehnici este critică (Armstrong și Schultz, 2008).

Structura agarozei și mecanismul de migrare al ADN-ului

Agaroza este un poliglucid natural extras din alge marine, alcătuit din unități repetitive ale diglucidului agarobioză. Acest diglucid este compus dintr-un rest de D-galactoză și unul de L-3,6-anhidrogalactoză unite prin legături β -1,4. Lanțurile de agaroză formează fibre spiralate care se agregă în structuri supraspiralate cu diametrul de 20-30 nm. Sub formă de gel, agaroza formează o structură tridimensională cu pori având diametrul cuprins între 50-200 nm (Kirkpatrick, 1990; Norton et al., 1986).

ADN-ul este încărcat negativ și va migra spre polul pozitiv sub influența curentului electric. Viteza de migrare este invers proporțională cu dimensiunea fragmentelor și direct proporțională cu tensiunea aplicată (Calladine și colab., 1991). Porii gelului crează un efect de sită, astfel încât moleculele mici vor trece mult mai rapid prin pori decât moleculele mari.

Aceste relații sunt valabile până la o valoare limită a dimensiunilor fragmentelor de ADN, dimensiune care este definită de compoziția gelului și de tensiunea curentului electric aplicat (Hervet și Bean, 1987). Atunci când se depășește această valoare, efectul de filtrare al gelului dispare, iar fragmentele de ADN se orientează în sensul minimizării rezistenței la înaintare. Fragmentele se orientează în așa fel încât unul dintre capete pătrunde prin pori, restul moleculei urmându-l (Slater și colab., 1996). Pentru a descrie comportarea ADN-ului în timpul electroforezei în geluri de agaroză, au fost dezvoltate diverse modele. Cel mai simplu model este cel în care moleculele de ADN șerpuesc printre porii gelului (Lalande et al., 1987) (figura 12). Și în acest caz moleculele mici vor migra mai rapid decât cele mari, deoarece creșterea dimensiunii moleculei duce la creșterea forțelor de frecare dintre moleculă și gel. Totodată, moleculele mari se pot “înnoda” în gel, conducând la un proces suplimentar de întârziere. Moleculele mari de ADN vor migra mult mai puțin prin gel deoarece fenomenul de înnodare elimină complet șerpuirea. Dimensiunea limită la care procesul de înnodare acoperă total șerpuirea este de 30 kb. Prin urmare, fragmente de 30 kb sau mai mari vor migra perfect identic și nu vor putea fi separate prin metode clasice.

Acest dezavantaj al electroforezei în geluri de agaroză a fost eliminat de Schwartz și Cantor în 1984 care au introdus electroforeza în câmp pulsatoriu (*engl. Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Această metodă permitea inițial separarea unor fragmente cu dimensiuni de până la 2 Mb. Îmbunătățirile aduse ulterior au permis separarea unor fragmente mai mari de 6 Mb, iar domeniul de aplicabilitate al electroforezei în geluri de agaroză s-a lărgit considerabil.

În funcție de condițiile specifice utilizate, au fost descrise 2 tipuri de electroforeză în geluri de agaroză: nativă și denaturantă (descrisă pentru prima dată de McDonell și colab. în anul 1977). Electroforeza nativă presupune separarea moleculelor de ADN în stare nativă, adică structura naturală a ADN-ului este menținută, iar în cazul celei denaturante, separarea este realizată la valori mari de pH și utilizată pentru separarea în funcție de dimensiunea catenelor de ADN (Mihășan et al., 2012).

Indiferent de tipul de electroforeză utilizat, viteza de migrare a fragmentelor de ADN este influențată de o serie de factori, precum: dimensiunea și topologia moleculelor de ADN (subcapitolul IV.2.), concentrația și tipul agarozei, tensiunea aplicată și soluția tampon de electroforeză.

Diversi producători oferă tipuri variate de agaroză, cu proprietăți diferite în ceea ce privește punctul de gelificare, punctul de topire, lungimea lanțurilor poliglucidice sau gradul de contaminare cu alte poliglucide sau proteine. Există două tipuri mari de agaroză și anume:

agaroză standard și agaroză cu temperatură de topire scăzută. O a treia clasă, care începe să fie din ce în ce mai mult utilizată, prezintă proprietăți intermediare (Mihășan et al., 2012).

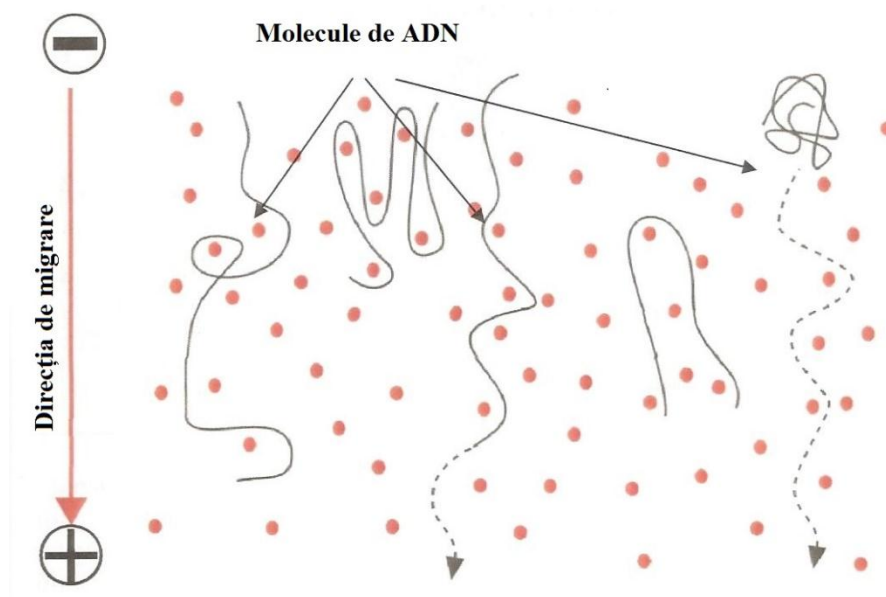


Figura 12. Migrarea prin șerpuire și înnodarea moleculelor de ADN (după Richard, 2004)

La valori mici ale tensiunii aplicate, viteza de migrare a ADN-ului este proporțională cu voltajul aplicat pe gel. Totuși, odată cu creșterea tensiunii aplicate, mobilitatea moleculelor de dimensiuni mari crește diferentiat astfel că rezoluția gelului scade odată cu creșterea voltajului. Pentru fragmentele mai mari de 2 kb, se recomandă aplicarea unei tensiuni care să nu depășească 5-8 V/cm gel (Mihășan et al., 2012).

În absența ionilor, conductivitatea apei este minimă motiv pentru care migrarea electroforetică a moleculelor de ADN se realizează foarte lent. Odată cu creșterea tăriei ionice (prin mărirea concentrației de ioni dizolvați) conductibilitatea soluției crește, în același timp crescând și cantitatea de căldură generată. Din acest motiv, concentrația soluțiilor tampon utilizate pentru electroforeză este crucială pentru buna desfășurare a separării. Cele mai folosite soluții tampon utilizate pentru separarea electroforetică a acizilor nucleici sunt TRIS-Acetat-EDTA pH 8 (TAE), TRIS-Borat-EDTA (TBE) sau TRIS-Fosfat-EDTA (TPE). TAE are capacitate mai mică de tamponare și de aceea în cazurile unor migrări prelungite, zona anodică devine puternic acidă, nefiind recomandată utilizarea acestei soluții tampon. Celelalte soluții, TBE și TPE, au capacitate de tamponare mai mare (Mihășan et al., 2012).

În acest studiu, electroforeza nativă în geluri de agaroză a îndeplinit două roluri importante: **detectarea** moleculelor de ADN de interes și **separarea** acestora de celelalte molecule de aceeași natură în funcție de masa moleculară.

Utilizarea acestei tehnici a permis separarea ADN-ului total în ADN plasmidial și ADN cromozomial, dar și separarea produsului de PCR (genele *6hln0* și *sad*) față de matrița de ADN utilizată pentru reacția de amplificare. Totodată, puritatea și cantitatea de ADN plasmidial obținută în urma extracției din gel a fost de asemenea evaluată tot prin electroforeză în geluri de agaroză.

Evidențierea ADN-ului pe gelurile de agaroză a fost realizată prin utilizarea colorantului bromură de etidiu, compus care conține un sistem heterociclic plan și care are proprietatea de a se intercala între nucleotidele ADN-ului. Intercalarea bromurii de etidiu între catenele de ADN este aproape independentă de secvența de nucleotide, cantitatea de colorant fiind dependentă doar de lungimea fragmentului de ADN (o moleculă de ADN la 2,5 pb). Compusul se așază perpendicular pe axul dublului helix, realizând legături de tip van der Waals cu bazele azotate de deasupra și de dedesuptul planului sistemului heterociclic. Această poziție fixă în zona hidrofobă dintre perechile de baze ale ADN-ului face ca bromura de etidiu legată de ADN să manifeste fluorescență crescută față de cea aflată în stare liberă în soluție. Bromura de etidiu poate fi folosită atât pentru detecția moleculelor dublu catenare cât și a celor monocatenare însă intensitatea fluorescenței este mai mică în cazul celei din urmă (Mihășan et al., 2012).

Principiul metodei

Moleculele de ADN încărcate negativ datorită resturilor de fosfat, plasate într-un câmp electric vor migra spre electrodul pozitiv. Într-un gel de agaroză, viteza de migrare a moleculelor de ADN la aplicarea unui câmp electric va depinde pe de o parte de sarcina moleculelor și, pe de altă parte, de dimensiunea moleculelor datorită efectului de sită al gelului. În acest fel are loc separarea fragmentelor de ADN în funcție de lungimea lor, respectiv în funcție de masa moleculară (Mihășan et al., 2012).

Materiale necesare:

- Probe de ADN în apă distilată obținute după precipitare;
- Agaroză (Bioprobe Systems);
- Soluție stoc tampon electroforeză TRIS/Acid acetic/EDTA (TAE) 50X: s-au cântărit 242g TRIS bază și se dizolvă în aproximativ 750 ml apă distilată; s-a adăugat cu grijă 57,1 ml acid acetic glacial și 100 ml soluție 0,5 M EDTA (pH 8 corectat cu KOH); s-a ajustat volumul final la 1 L; pentru prepararea unui volum de 5 L TAE 1X, 100 ml TAE 50X se aduc la un volum final de 5 L cu apă distilată;

- Soluție stoc bromură de etidiu 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Germania) – se dizolvă 50 mg bromură de etidiu în 100 ml apă distilată. Soluția se păstrează la întuneric pe timp nelimitat;
- Soluție tampon de încărcare 6X (Fermentas, Thermo Fisher Scientific);
- Marker de masă moleculară GeneRuler™ 100-10000 bp (Fermentas, Thermo Fisher Scientific);
- Sistem orizontal de electroforeză și sistem de turnare al gelului dotat cu pieptene pentru formarea godeurilor (Biorad);
- Sursă de curent Power Pac 1000 (Biorad);
- Transiluminator Gel Doc 2000 (Biorad);
- Cuptor cu microunde;

Mod de lucru:

1. S-a asamblat modulul de turnare a gelului urmând indicațiile producătorului;
2. Cuvă de electroforeză a fost umplută cu soluție tampon TAE 1X;
3. S-a realizat gelul de agaroză de concentrație 0,75% în soluție tampon TAE 1X astel: într-un flacon Erlenmayer, s-a adăugat 0,375 g agaroză în 50 ml TAE 1X (volumul final nu a depășit 50% din volumul flaconului);
4. Amestecul obținut a fost încălzit în cuptorul cu microunde până la topirea completă a agarozei;
5. Soluția a fost lăsată la răcit (până la aproximativ 60°C) după care s-a adăugat 10 μl de soluție bromură de etidiu 0,5 mg/ml;
6. Soluția caldă s-a introdus în sistemul de turnat geluri al cuvei și s-a inserat pieptenele pentru formarea godeurilor;
7. Gelul a fost lăsat la răcit 20-40 de minute, la temperatura camerei;
8. După răcire, gelul a fost plasat în cuva de electroforeză și s-a adăugat o cantitate suficientă de soluție tampon TAE 1X pentru a acoperi complet gelul;
9. Probele de ADN obținute au fost amestecate cu soluție tampon de încărcare 6X în raport de 6:1. Cu o pipetă automată, godeurile au fost încărcate cu un volum de 18 μl de probă și 3 μl de marker de masă moleculară;
10. Capacul cuvei a fost închis și s-a conectat la sursa de curent. Probele au fost plasate spre catod pentru a migra spre anod. Tensiunea aplicată a fost de 120V.

11. În timpul migrării, după întreruperea alimentării cuvei, gelul a fost scos și analizat pe transiluminator până s-a obținut nivelul dorit al rezoluției de separare;
12. După terminarea migrării, alimentarea a fost oprită, iar gelul a fost scos și plasat pe transiluminator pentru analiză și fotografiere.

III.4. Amplificarea ADN-ului prin PCR

Tehnica de amplificare *in vitro* a acizilor nucleici folosește același mecanism bazat pe o ADN-polimeraza ADN-dependentă întâlnit și în cazul replicării *in vivo* a ADN-ului. Deși principiul și mecanismul amplificării *in vitro* au fost formulate încă din anul 1971 de Kleppe et al., tehnica în sine a fost descrisă abia în anul 1986 de două echipe de cercetători, Mullis et al. și Saiki et al.. Atunci a primit și numele cu care s-a consacrat: *Polymerase Chain Reaction*, sau prescurtat PCR.

Principiul metodei

Amplificarea enzimatică *in vitro* a ADN-ului sau PCR este o reacție de replicare enzimatică în lanț a ADN-ului matriță monocatenar. Pe acest lanț unic de ADN se poate sintetiza un lanț complementar cu ajutorul ADN-polimerazei și în prezența unui oligonucleotid (15-20 nucleotide) amorsă (primer). Pentru a porni sinteza noului lanț ADN pe un lanț ADN matriță, ADN-polimeraza necesită prezența pe matriță a unui primer cu capătul 3'-OH liber. La acest capăt urmează a se fixa nucleotidele ADN care vor forma noul lanț (Israil, 2000).

Materiale necesare:

1. Sursa de ADN, obținută de la cele două tulpini utilizate în acest studiu (*A. nicotinovorans* pAO1 și respectiv AK-YN10), este reprezentată de:
 - Suspensie celulară;
 - ADN total (cromozomial și plasmidial) izolat din celule;
 - ADN plasmidial izolat din gelul de agaroză;
2. Setul de oligonucleotide amorsă (*primer*), complementare cu secvența amplificată;
3. Apă distilată sterilă;
4. Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) – ADN polimeraza, o proteină recombinată și termostabilă care este descrisă astfel:
 - Activitate exonucleazică 3'-5' absentă (nu corectează eventuale greșeli de inserție);

- Fidelitate foarte mică (precizie redusă la inserarea nucleotidelor);
 - Stabilitate termică (timp de înjumătățire) de 40-60 minute la 95°C;
5. Soluție tampon PCR 10X (+KCl, -MgCl₂) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific);
 6. Soluție stoc deoxiribonucleozide-trifosfat (dNTP) 10mM (Roche, Germania) – a fost achiziționată sub forma unui set de 4 fiole, fiecare conținând o soluție 100mM a unui deoxiribonucleozid-trifosfat. O soluție stoc de 100 μl se prepară prin pipetarea într-o microeprubetă a câte 10 μl soluție 100mM din fiecare dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) și 60 μl apă distilată sterilă;
 7. Soluție MgCl₂ 25mM (Fermentas, Thermo Fisher Scientific);
 8. Microeprubete sterile pentru PCR, de tip Eppendorf, cu pereți subțiri, care permit schimbul rapid de căldură, cu volum maxim de 0,2 ml;
 9. Termociclor Biometra T Gradient (figura 13) esențial pentru buna desfășurare a reacției de amplificare și dotat cu o serie de parametri funcționali precum:
 - Viteza de încălzire/răcire – în minim 30 de secunde blocul ajunge de la 55°C la 94°C;
 - Blocul termic pentru probe este dimensionat la volumul microeprubetelor PCR;
 - Capac de încălzire – previne condensarea din interiorul microeprubetelor;
 - Capacitatea de a realiza un gradient de temperatură de-a lungul blocului termic;
 - Capacitatea de a programa aparatul și de a salva programul în memoria acestuia în vederea reutilizării.



Figura 13. Termociclorul Biometra T Gradient utilizat în reacția de amplificare a genelor de interes

Mod de lucru:

Etapetele parcurse pentru realizarea reacției standard de amplificare *in vitro* a ADN-ului sunt următoarele:

1. Pregătirea unui volum de 25 μ l de amestec de reacție (master mix) prin pipetarea reactivilor într-o microeprubetă sterilă, conform indicațiilor:

Reactiv	Cantitate pentru o probă	Observații
Oligonucleotide amorsă (primer)	10 pm	
Tampon PCR 10X (+KCl, -MgCl ₂)	2,5 μ l	
dNTP (10mM)	0,5 μ l	
MgCl ₂ (25mM)	variabilă	Este utilizat pentru îmbunătățirea randamentului reacției. În general, creșterea concentrației de Mg ²⁺ duce la scăderea specificității amplificării; Concentrația optimă este dependentă de concentrația de dNTP, primer și ADN matriță.
Apă distilată sterilă	până la volumul total de 23,5 - 24 μ l	Volumul de apă a variat în funcție de volumul de primer și ADN-matriță utilizat

2. Un volum de 23,5 - 24 μ l din master mix a fost transvazat într-un număr corespunzător de eprubete PCR sterilizate și notate în prealabil;
3. S-a pipetat cu atenție 0,5 μ l din soluția de ADN de amplificat (suspensie celulară și ADN total) și respectiv 1 μ l din soluția ce conține ADN plasmidial;
4. Termociclorul a fost programat urmând indicațiile producătorului pentru realizarea etapelor necesare amplificării, după cum urmează:

Etapă	Temperatură (°C)	Timp	Observații
1. Denaturarea inițială (Hot Start)	95	5 minute	
2. Denaturare	95	1 minut	
3. Legarea oligonucleotidelor amorsă (primer)	variabilă	45 secunde	Temperatura depinde de valoarea temperaturii de topire (T_m) specifice fiecărei perechi de primer
4. Sinteză	72	variabil	Timpul depinde de dimensiunea fragmentului de ADN amplificat și de viteza de sinteză a enzimei utilizate. O bună aproximare a vitezei de sinteză este de 1 kb/min.
Etapete 2 – 4 se repetă de 30 de ori			
5. Finalizarea sintezei	72	10 minute	
6. Finalizarea reacției	4	-	Păstrarea probelor la o temperatură optimă până la intervenția operatorului.

5. În locașul blocului termic al termociclorului, s-au amplasat microeprubetele și s-a pornit programul presetat în etapa anterioară;
6. La atingerea temperaturii de 95°C din prima etapă (Denaturarea inițială – Hot Start) s-a adăugat 2,5 U (0,5 μl) ADN polimerază și s-a omogenizat prin pipetare. Această etapă poartă denumirea de Hot-Start (pornire la cald) și este necesară deoarece amestecul de reacție se prepară pe gheață și astfel oligonucleotidele amorsă se pot lega nespecific. Unele polimeraze, printre care și *Taq*, au activitate polimerazică reziduală la temperaturi mici, fapt ce conduce la începerea amplificării din momentul adăugării enzimei în amestecul de reacție. Prin adăugarea enzimei la temperaturi de peste 95°C (când ADN-ul este denaturat) se împiedică apariția reacțiilor de amplificare nespecifice (Mihășan et al., 2012).
7. După finalizarea programului PCR, microeprubetele se scot din termociclor și pot fi păstrate, pentru perioade scurte de timp, la temperatura de 4°C;
8. Randamentul reacției de amplificare a fost evaluat prin electroforeză în geluri de agaroză.

IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII

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

Pe parcursul experimentului nostru, au fost examinate aspectele morfologice și tinctoriale ale tulpinilor *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1.

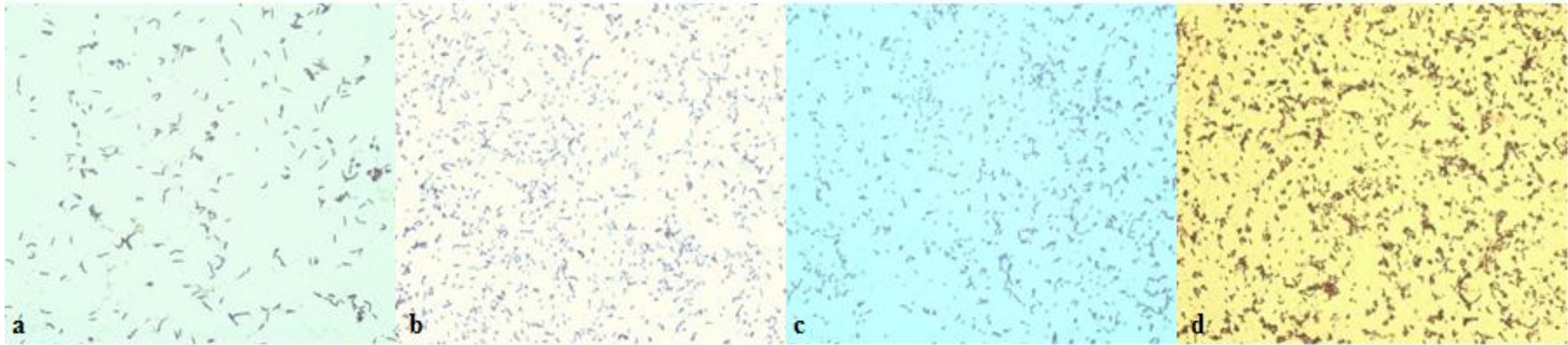
În vederea examinării, bacteriile sunt depuse pe o lamă sterilă din sticlă. Operațiunea de întindere a materialului bacterian pe lamă este denumită, în mod curent, “executarea unui frotiu”, termenul de frotiu fiind utilizat pentru desemnarea lamei cu materialul microbial etalat pe suprafața ei (Dunca et al., 2007).

Pentru început, materialul reprezentat de o picătură din cultura microbială a fost etalat pe suprafața lamei, frotiul fiind apoi lăsat la uscat la temperatura camerei. Proteinele microbiene sunt denaturate prin fixare și totodată mecanismul intim al colorației este facilitat, în sensul că se mărește afinitatea structurilor celulare pentru colorant (Dunca et al., 2007). Respectând indicațiile din subcapitolul III.1.3., frotiurile obținute au fost ulterior colorate prin metoda Gram.

Prima fază corespunde absorbției și difuziunii colorantului bazic (violetul de metil) în interiorul protoplasmei. Mordantul (soluția Lugol) reacționează cu colorantul dând naștere unui complex insolubil mordant-colorant. La bacteriile Gram pozitive, complexul mordant-colorant este puternic fixat de structura polizaharido-ribonucleoproteică a peretelui celular și a membranei citoplasmatică. Decolorarea cu alcool-acetonă corespunde solubilizării complexului mordant-colorant la bacteriile Gram negative. Consecutiv procesului de solubilizare, colorantul este antrenat odată cu decolorantul în afara celulei bacteriene. În cazul bacteriilor Gram pozitive, decolorantul nu poate realiza solubilizarea complexului mordant-colorant. Ultima fază, de fapt o fază auxiliară, corespunde recolorării celulelor care au fost decolorate cu alcool-acetonă. Aceasta se realizează cu ajutorul unui colorant, specific pentru protoplasmă (diferit de violetul de metil), așa cum este fucsina bazică (Dunca et al., 2007).

După finalizarea frotiurilor, acestea au fost examinate la un microscop confocal dotat cu cameră. După cum se poate observa în figura 14, tulpinile *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 prezintă o dezvoltare și o morfologie similară. În urma colorației Gram, celulele ambelor tulpini apar colorate în violet, fapt ce sugerează apartenența acestor sușe la grupul bacteriilor Gram pozitive.

Arthrobacter sp. AK-YN10



Arthrobacter nicotinovorans pAO1

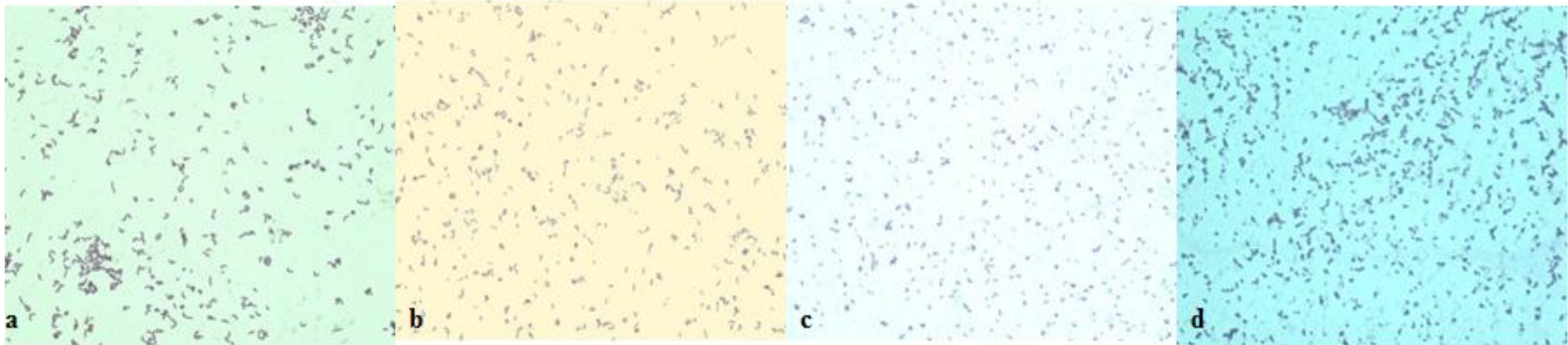


Figura 14. Tulpinile *A. nicotinovorans* pAO1 (ATCC 49919) și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 crescute în mediu citrat lichid la 28°C; **a**, după 12 ore; **b**, după 24 ore; **c**, după 36 ore; **d**, după 48 ore

IV.2. Izolarea și separarea ADN-ului total din celulele de *Arthrobacter*

Prima etapă a studiului nostru a constat în izolarea ADN-ului total din celulele tulpinilor *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 și separarea acestuia în ADN plasmidial și respectiv ADN cromozomial (genomic) prin electroforeză în geluri de agaroză, metodă descrisă în detaliu în subcapitolul III.3.

Pentru izolarea ADN-ului plasmidial din celulele celor două tulpini, a fost utilizată o procedură simplă descrisă de Anderson și McKay în anul 1983 pentru izolarea rapidă a plasmizilor mai mari de 30 MDa din *Streptococcus lactis*. Acest protocol poate fi utilizat pe o scală preparativă pentru a izola cantități suficiente de ADN plasmidial necesare pentru digestie enzimatică, clonare sau experimente de transformare. Totodată, protocolul a fost aplicat și la scală redusă unde s-a dovedit a fi foarte util pentru examinarea rapidă a conținutului de ADN plasmidial din streptococii lactici. Cu această metodologie, plasmizii mari nedetecțai anterior au putut fi observați.

Cu ajutorul protocolului menționat mai sus, din celulele celor două tulpini a fost izolat ADN-ul total care este compus din molecule de ADN plasmidial și cromozomial. Întreaga cantitate de ADN total obținută dintr-un volum de cultură de 10 ml a fost ulterior supusă migrării electroforetice în gel de agaroză în vederea separării moleculelor de ADN în funcție de dimensiunea acestora. Pentru a obține o cantitate mai mare de ADN total și implicit ADN plasmidial, s-au folosit și volume de 100 ml de cultură.

Viteza de migrare a fragmentelor de ADN pe parcursul electroforezei în gel de agaroză este influențată de o serie de factori importanți printre care se numără dimensiunea și topologia moleculelor de ADN. Un exemplu ce demonstrează foarte bine acest lucru este comportamentul unei molecule de ADN plasmidial bacterian ce poate migra sub 3 forme (figura 15): ADN supraspiralizat, circular și liniar (Mihășan și colab., 2012).

Atunci când molecula de ADN este puternic spiralizată, masa aparentă este redusă astfel încât ADN-ul migrează cu viteză mare la aplicarea curentului electric. Dacă doar una dintre catene este clivată, molecula va adopta o conformație relaxată și de aceea viteza de migrare se va diminua mult. În cazul în care ambele catene sunt clivate, molecula se comportă normal și migrează cu o viteză intermediară (Mihășan și colab., 2012).

După cum se poate observa în figura 15, moleculele circulare migrează diferit față de cele liniare, motiv pentru care masa moleculară a plasmizilor circulari nu poate fi apreciată prin comparare cu markeri de masă alcătuiți din fragmente liniare (Mihășan et al., 2012).

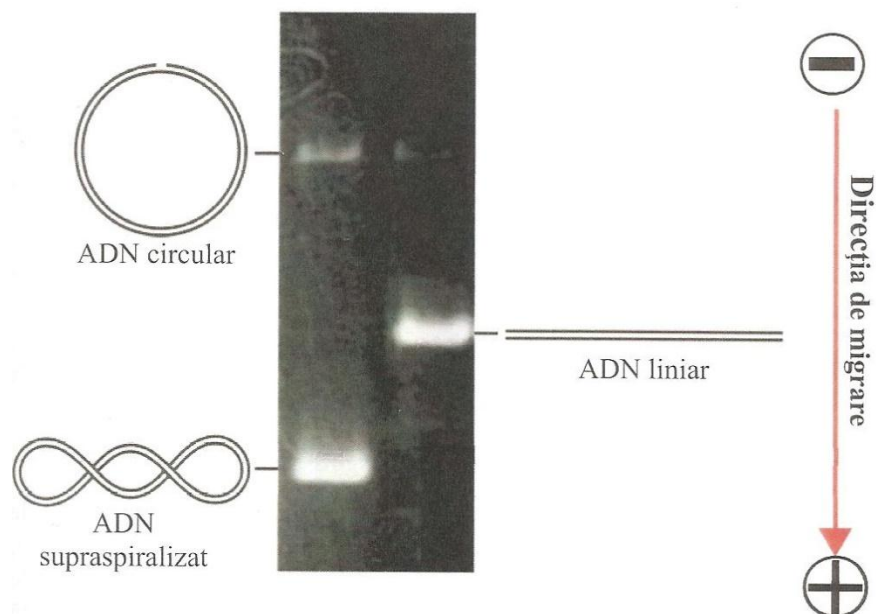


Figura 15. Influența topologiei moleculei de ADN asupra separării electroforetice (Richard, 2004)

Pentru separarea electroforetică a ADN-ului total, s-a folosit un gel de agaroză de concentrație 0,75% preparat în 50 ml soluție tampon TAE 1X în care s-au adăugat 10 μ l soluție de bromură de etidiu (10 mg/ml). Bromura de etidiu a fost necesară pentru a putea vizualiza ADN-ul folosind lumina ultraviolet (UV). În tabelul 4 este indicată ordinea în care s-au încărcat godeurile gelului. În godeurile 1-4 s-au introdus probele de ADN obținute din celulele tulpinii AK-YN10, iar în 5-8 cele obținute din tulpina *A. nicotinovorans* pAO1. Chiar dacă masa moleculară a plasmizilor nu poate fi apreciată, într-un godeu situat central a fost plasat și markerul de 100-10000 bp.

Tabel 4. Soluțiile de ADN total încărcate în gelul de agaroză

	1	2	3	4	Marker	5	6	7	8
Soluție tampon de încărcare 6X (μl)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Soluție ADN total (μl)	15	15	15	15	X	15	15	15	15

În figura 16 se poate observa rezultatul separării electroforetice a ADN-ului total: în cazul ambelor tulpini bacteriene au fost identificate și încadrate cu roșu benzile corespunzătoare ADN-ului plasmidial, în timp ce fragmentele corespunzătoare ADN-ului genomic au fost încadrate cu albastru. Deși ADN-ul genomic are o dimensiune mai mare față de cel plasmidial, acesta a migrat cu o viteză mai mare deoarece, în timpul tehnicilor de

extracție, ADN-ul cromozomial a fost fragmentat în mod artificial în segmente mai mici, acestea din urmă migrând cu viteze mari.

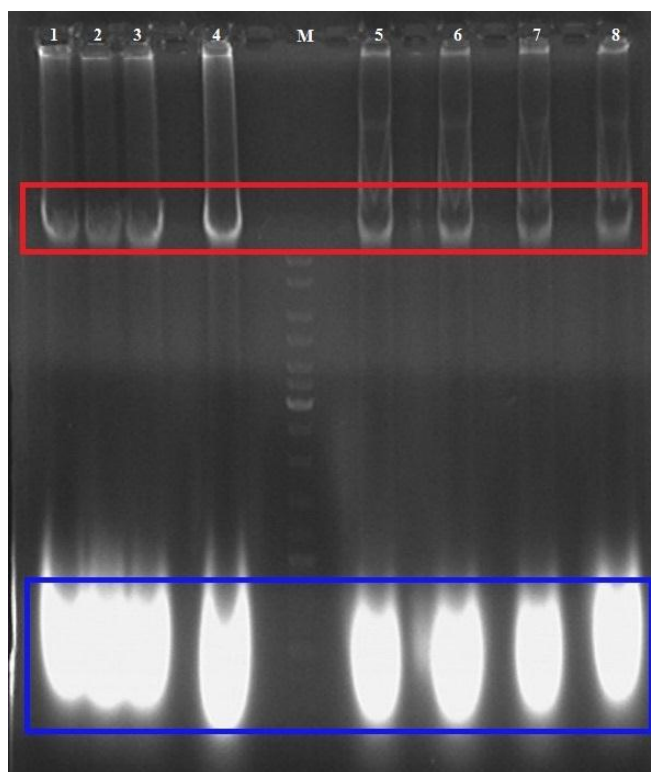


Figura 16. Migrarea în gelul de agaroză a ADN-ului total obținut din celulele de AK-YN10 (1-4) și *A. nicotinovorans* pAO1 (5-8)

În natură, specia *Arthrobacter nicotinovorans* conține megaplasmidul pAO1 pe care este localizat grupul (*cluster*-ul) de gene *nic* responsabile de degradarea nicotinei. În acest grup se găsesc și genele *6hln* și *sad* a căror prezență încercăm să o evidențiem în tulpina AK-YN10. Din acest motiv, în acest studiu, sușa *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 a fost utilizată ca un control pozitiv.

Identificarea benzilor de ADN plasmidial în godeurile 1-4 confirmă faptul că există cel puțin un plasmid în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10.

Întreaga cantitate de ADN total izolat din celulele celor două sușe a fost separată electroforetic și a dus la obținerea mai multor geluri. Fotografiile acestor geluri sunt prezentate în capitolul VI.

IV.3. Purificarea ADN-ului plasmidial

În biologia moleculară, extracția sau izolarea din gel reprezintă o tehnică utilizată pentru a izola un fragment de ADN de interes intact dintr-un gel de agaroză, acesta fiind în prealabil separat electroforetic. După extracție, fragmentele de interes pot fi utilizate ulterior

în alte aplicații (ligări, transformări, fosforilări, etc.). Acest proces, efectuat de obicei pe plasmide, este baza pentru ingineria genetică rudimentară. După ce probele de ADN sunt separate electroforetic într-un gel de agaroză, extracția implică patru etape de bază: identificarea fragmentelor de interes, izolarea benzilor corespunzătoare, izolarea ADN-ului din acele benzi și îndepărtarea sărurilor și a coloranților (Zymo Research, n.d.).

Pentru început, gelurile de agaroză utilizate pentru separarea ADN-ului total au fost expuse la lumina ultraviolet (UV) iar ADN-ul colorat cu bromură de etidiu a fost pus în evidență. A fost evitată expunerea prelungită a ADN-ului la radiații mutagene a luminii UV. Benzile corespunzătoare ADN-ului plasmidial au fost decupate din gel cu ajutorul unui bisturiu (figura 17).

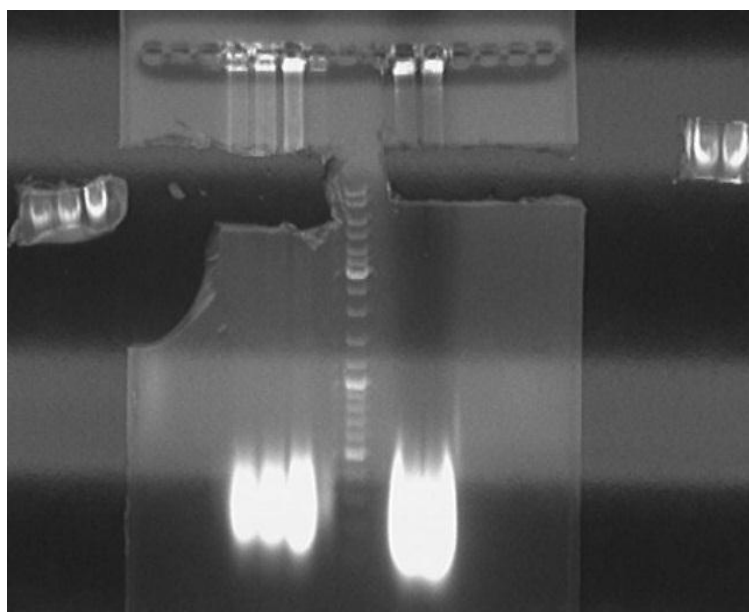


Figura 17. Excizarea din gelul de agaroză a benzilor corespunzătoare ADN-ului plasmidial

ADN-ul plasmidial a fost purificat folosind trusa Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Acest kit conține toate materialele necesare pentru purificarea rapidă a ADN-ului de înaltă calitate din geluri de agaroză preparate în soluție tampon TAE (subcapitolul III.2.5.). Respectând indicațiile din protocolul inclus în această trusă, fragmentul de agar excizat din gel și în care se găsește ADN-ul plasmidial a fost topit la temperatura de 50°C în prezența agenților chaotropici (compuși ce distrug structurile macromoleculare), iar ADN-ul a fost izolat utilizând coloane prevăzute cu membrane de siliciu (Spin Column). Acestea au capacitatea de a lega fragmentele de ADN la concentrații mari de săruri, eluarea realizându-se într-un volum mic (15 μl) de apă distilată prin modificarea tăriei ionice și a pH-ului.

Puritatea ADN-ului plasmidial a fost evaluată prin electroforeză în gel de agaroză. Astfel, godeurile unui gel de agaroză au fost încărcate cu soluție tampon de încărcare 6X și cu

un volum de 5 și 10 μ l de soluție de ADN plasmidial originar din *A. nicotinovorans* pAO1 (godeurile 1 și 3) și respectiv AK-YN10 (godeurile 2 și 4) (tabel 5).

Tabel 5. Ordinea de încărcare a soluției de ADN plasmidial în gelul de agaroză

	1	Marker	2	3	4
Soluție tampon de încărcare(μl)	1	3	1	2	2
Soluție ADN plasmidial (μl)	5	X	5	10	10

În figura 18 se poate observa că procesul de purificare a ADN-ului plasmidial a avut succes, identificându-se în fiecare godeu benzile corespunzătoare acestui tip de ADN, însă randamentul de obținere este extrem de scăzut. Acest lucru poate fi cauzat de kit-ul de purificare utilizat deoarece, în specificațiile acestui produs se recomandă ca ADN-ul ce urmează a fi purificat să aibă o dimensiune cuprinsă între 50 pb și 23 kb. Megaplasmidul pAO1 al tulpinii *A. nicotinovorans* are o dimensiune de peste 165 kb, iar dimensiunea ADN-ului plasmidial din AK-YN10 este necunoscută.

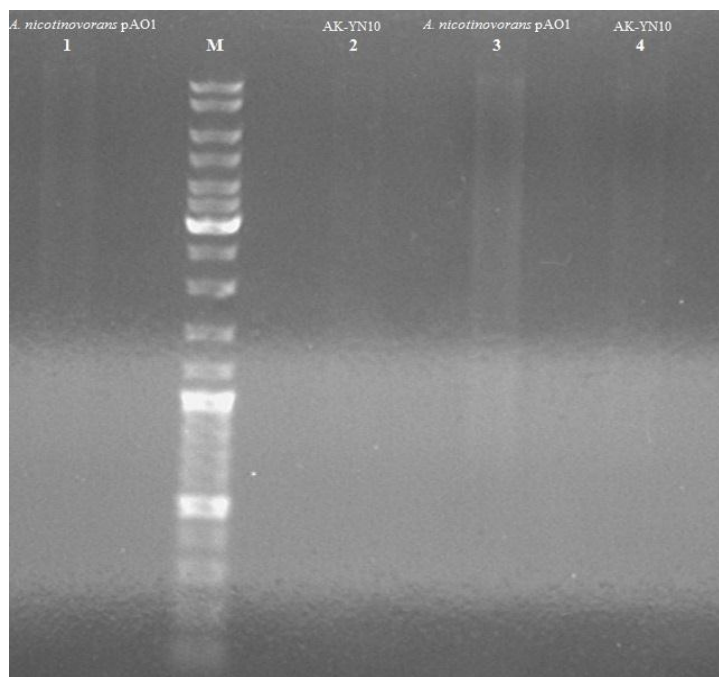


Figura 18. Testarea purității ADN-ului plasmidial prin electroforeză în gel de agaroză

IV.4. Stabilirea condițiilor optime de amplificare prin PCR

IV.4.1. Alegerea primerilor pentru amplificarea genelor de interes

Conform bazei de date NCBI, secvența nucleotidică a genei *6hln0* are o lungime de 1278 pb și începe din poziția 92827 și se termină în poziția 91550. Gena codifică enzima

dimeră 6-hidroxi-L-nicotin-oxidaza (6HLNO), o flavoproteină cu masa moleculară de 46 kDa ce face parte din clasa aminoxidazelor. Această enzimă acționează în a doua etapă a căii metabolice de degradare a nicotinei unde catalizează oxidarea 6-hidroxi-nicotinei. Produsul acestei reacții este 6-hidroxi-metilmiosmina [3-(4,5-dihidro-1H-pirol-2-il)-piridina], compus instabil ce reacționează spontan cu apa formând 6-hidroxi-pseudo-oxinicotina. Gena *6hlno* este plasată în aceeași direcție și în imediata apropiere a genelor *ndhLSM* alcătuind aparent un operon, după cum se poate vedea în figura 19 (Mihășan et al., 2012).

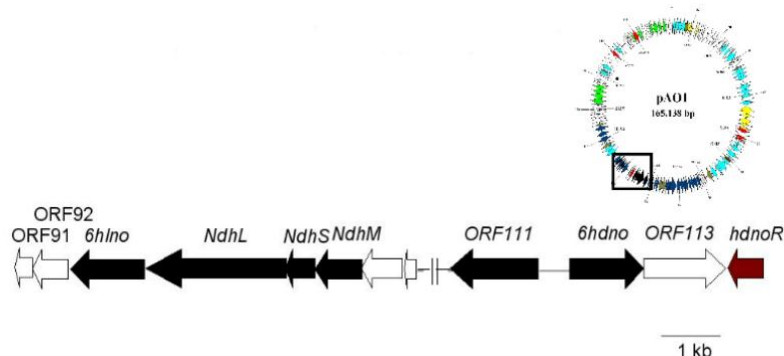


Figura 19. Modul de aranjare și localizarea genei *6hlno* implicată în codificarea enzimei 6HLNO (Mihășan, 2011)

Secvența genei *sad* are o lungime de 1353 pb și începe din poziția 58936 și se termină în poziția 57584. Această genă codifică succinic-semialdehid-dehidrogenaza (SsaDH), enzimă implicată în etapele finale ale catabolismului nicotinei. Semialdehida acidului succinic este convertită prin intermediul enzimei SsaDH în acid succinic. Acidul succinic poate urma calea acizilor tricarboxilici completând astfel catabolismul fragmentului de pirolidină a nicotinei (Chiribau et al., 2006). Gena a fost clonată și proteina purificată prin IMAC (*engl.* **I**mmobilized **M**etal **A**ffinity **C**hromatography), în soluție fiind homo-dimeră, monomerul având masa moleculară de 51 kDa (Mihășan et al., 2012). În figura 20 se poate observa direcția genei *sad* ce codifică enzima SsaDH.

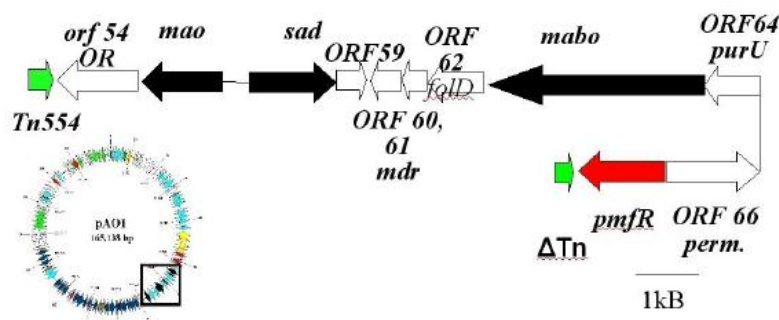


Figura 20. Modul de aranjare și localizarea genei *sad* implicată în codificarea enzimei SsaDH (Mihășan, 2011)

Întregul proces de amplificare *in vitro* a ADN-ului se bazează pe capacitatea oligonucleotidelor amorsă (primer) de a se lega de ADN-ul matriță și din acest motiv alegerea corectă a secvenței acestora este elementul cheie ce poate face diferența dintre un PCR reușit și un eșec total. Cunoscând secvența genei de amplificat și respectând câteva reguli simple exemplificate mai jos, este posibilă, în principiu, alegerea unor oligonucleotide amorsă (primer) pentru amplificarea oricărei secvențe ADN cu dimensiuni cuprinse între 200-400 kb (Mihășan et al., 2012).

Secvențele nucleotidice ale primerilor au fost stabilite respectând o serie de reguli generale. Cel mai important parametru pentru selecția secvenței celor doi primeri este, bineînțeles, capacitatea acestora de a se lega pe bază de complementaritate de secvență de molecula ADN de interes și de a forma un duplex stabil cu aceasta. Situs-urile de legare trebuie să flancheze regiunea ADN de amplificat, să fie specifice pentru fiecare oligonucleotidă și, de asemenea, să fie unice adică să nu se repete în molecula de ADN matriță. Deși probabilitatea ca o secvență de dimensiunea unui primer să se repete în fragmentele de 2-3 kb amplificate în mod obișnuit prin PCR este destul de mică, odată cu creșterea dimensiunii fragmentului de amplificat, probabilitatea crește drastic. Din acest motiv, pentru ampliconi de dimensiuni mari, este indicat să se utilizeze programe precum BLAST pentru verificarea unicității secvenței setului de primeri ales (Mihășan et al., 2012).

Calitatea amplificării este dată și de lungimea oligonucleotidelor amorsă ce trebuie să fie cuprinsă între 18 și 28 de nucleotide. Cu cât lungimea unei oligonucleotide este mai mare, cu atât specificitatea reacției PCR este mai mare, însă legarea la ADN-ul matriță este mai puțin eficientă și în consecință, cantitatea de ADN obținută în urma reacției de amplificare este mai mică. De asemenea, conținutul de GC este o altă condiție a unei bune specificități a primerilor și trebuie să fie cuprins între 40% și 60% (Mihășan et al., 2012).

Pentru a crește randamentul reacției de amplificare, oligonucleotidele amorsă trebuie să conțină cel mult trei nucleotide G sau C printre ultimele cinci nucleotide de la capatul 3'. Acest lucru duce la o asociere mai puternică a primerilor cu ADN-ul matriță, formându-se astfel o așa-numită clemă GC. Mai mult de trei nucleotide GC în ultimele cinci, face foarte dificilă disocierea duplexului rezultat, fapt ce duce la o scădere a randamentului reacției (Mihășan et al., 2012).

Prezența în primeri a structurilor secundare produse prin legături inter- sau intramoleculare între nucleotide poate duce la scăderea drastică a randamentului de amplificare sau chiar la stoparea completă a reacției. Cele mai importante structuri secundare care trebuie evitate sunt: acele de păr, auto-dimerii (formați prin asocierea pe bază de complementaritate a

două molecule ale unui oligonucleotid de același tip) și hetero-dimerii (formați prin asocierea pe bază de complementaritate a două molecule ale celor doi primeri utilizați pentru amplificare) (Mihășan et al., 2012).

Un alt criteriu pentru stabilirea secvenței oligonucleotidelor amorsă îl constituie repetițiile. Există două tipuri de repetiții care trebuie evitate, și anume: gruparea de două nucleotide care se repetă succesiv (ATATATATAT) și mai mult de patru repetiții ale aceleiași baze (GCCGGGGATGGGGGG). În primul caz se acceptă un număr de maxim patru repetiții.

Secvența și dimensiunea genelor amplificate au fost controlate prin intermediul a două oligonucleotide amorsă a căror secvență este prezentată în tabelul 6. Gena *6hln0* a fost amplificată cu setul de primeri HindIII6hlnofw și KpnI6hlnorev, iar gena *sad* a fost amplificată cu setul de primeri SDHBamHIfor și SDHBamHIfor. Fiecare set conține un primer sens (*forward*) și unul revers (*reverse*).

Cele două seturi de primeri utilizate în acest studiu au fost concepute și achiziționate în cadrul unui studiu anterior pentru amplificarea genelor *6hln0* și *sad* în tulpina *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. Aceste oligonucleotide amorsă vor fi utilizate pentru a evidenția prezența celor două gene în sușa *Arthrobacter* sp. AK-YN10.

Tabel 6. Oligonucleotidele amorsă utilizate pentru amplificarea genelor *6hln0* și *sad*

Genă	Primer	Secvență
<i>6hln0</i>	HindIII6hlnofw	5' AAG AAG GAA AGC TTT GTA TGA CGC GA3'
	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'

Primerii, HindIII6hlnofw și KpnI6hlnorev, utilizați pentru amplificarea genei *6hln0* au o lungime de 27 și respectiv 24 de nucleotide. În cazul genei *sad*, lungimea primerilor SDHBamHIfor și SDHXhoIrev este de 27 și respectiv 29 de nucleotide. Conținutul de GC a setului de primeri HindIII6hlnofw și KpnI6hlnorev este de 40% și respectiv 54%, în timp ce primerii SDHBamHIfor și SDHXhoIrev au un conținut de GC de 70% și 55%. În ceea ce privește clema GC, printre ultimele cinci nucleotide de la capatul 3' se găsesc patru nucleotide GC în primerii HindIII6hlnofw și SDHBamHIfor, trei nucleotide în KpnI6hlnorev și două nucleotide în SDHXhoIrev.

IV.4.2. Condițiile esențiale pentru reacția de amplificare

Specificitatea și randamentul reacției PCR nu depind doar de un singur factor, ci sunt controlate atât de compoziția amestecului de reacție (concentrația de $MgCl_2$) cât și de temperatura și durata fiecărei etape a ciclului de amplificare.

Timpu alocat etapei de sinteză depinde de dimensiunea fragmentului de ADN amplificat și de viteza de sinteză a enzimei utilizate. O bună aproximare a vitezei de sinteză este de 1 kb/min. Având în vedere faptul că genele de amplificat, *6hln* și *sad*, au o lungime de 1278 pb și respectiv 1353 pb, durata etapei de sinteză a fost setată la 2 minute pentru fiecare fragment amplificat.

Temperatura de topire (*melting temperature* – T_m) este un parametru esențial al reacției de amplificare. Acest parametru este definit ca fiind temperatura la care jumătate din moleculele de oligonucleotide amorsă sunt asociate cu ADN-matriță și reprezintă un indice al tăriei dublexului primer-ADN format. Temperatura de topire se calculează pentru fiecare primer în parte și este influențată direct de secvența specifică a acestuia. Au fost descrise mai multe modalități de calcul ale valorii T_m , cea mai corectă folosind noțiunile de entalpie și entropie, funcțiile de stare ale unui sistem termodinamic. Pentru a calcula valorile T_m ale oligonucleotidelor noastre, s-a folosit următoarea formulă: $T_m(^{\circ}C) = 4 \times (GC) + 2 \times (AT)$, unde G, C, A, T reprezintă numărul de nucleotide din secvența primerului ales.

Conform acestei formule, s-a calculat temperatura de topire pentru primerii utilizați în acest studiu.

- Primer sens HindIII6hlnofw (5' AAGAAGGAAAGCTTTGTATGACGCGA3');
 $T_m = 4 \times 11 + 2 \times 15$; $T_m=74^{\circ}C$;
- Primer revers KpnI6hlnorev (5' GTCTGCAGGTACCTACGAATGCAG3');
 $T_m = 4 \times 13 + 2 \times 11$; $T_m=74^{\circ}C$;
- Primer sens SDHBamHifor (5' GTGCGTGATCCGGATCCGGGGAGGTGC3');
 $T_m = 4 \times 19 + 2 \times 8$; $T_m=92^{\circ}C$;
- Primer revers SDHXhoIrev (5' CATGTAAGCCCCCTCGAGTCGTTTCAGTTC3');
 $T_m = 4 \times 16 + 2 \times 13$; $T_m=90^{\circ}C$.

În general, valoarea optimă a parametrului T_m este cuprinsă între $52^{\circ}C$ și $60^{\circ}C$ și trebuie să aibă valori apropiate pentru ambele oligonucleotide amorsă utilizate. Valoarea lui T_m este utilă pentru stabilirea temperaturii optime din etapa de legare a primerilor a ciclului PCR. Aceasta trebuie să fie mai mică cu câteva grade decât cea mai mică temperatură T_m a celor doi primeri utilizați (Mihășan et al., 2012).

Pentru a stabili temperatură optimă de legare a primerilor la matrița ADN, gena *6hln0* a fost amplificată utilizându-se un gradient de temperatură cuprins în intervalul 50°C – 70°C și unde au fost testate următoarele șase temperaturi: 50°C, 52°C, 56,5°C, 58,7°C, 66°C și 70°C. În calitate de ADN matriță s-a folosit suspensia celulară de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. În amestecul de reacție, preparat respectând indicațiile din subcapitolul III.4., s-a folosit concentrația finală medie de 2 mM de MgCl₂.

Electroforeza în gel de agaroză a fost utilizată pentru a evalua cantitatea de ADN produsă în urma reacției PCR și de a selecta temperatura la care randamentul reacției de amplificare este maxim. În tabelul 7 este indicată ordinea în care s-au încărcat godeurile gelului de agaroză, preparat conform indicațiilor din subcapitolul III.3., cu probele obținute în urma reacției de amplificare.

Tabel 7. Ordinea de încărcare a produsului amplificat (gena *6hln0*) în gelul de agaroză

	1	2	3	4	5	6	Marker
Soluție tampon de încărcare 6X (μl)	3	3	3	3	3	3	3
Soluție PCR (μl)	15	15	15	15	15	15	X

În figura 21 se poate observa faptul că în cazul tuturor temperaturilor testate, specificitatea amplificării s-a păstrat la un nivel ridicat. Randamentul maxim de amplificare s-a înregistrat la temperatura de 58,7°C, însă, cea mai bună specificitate s-a obținut la 66°C și 70°C. Din acest motiv, pentru amplificarea genei *6hln0* s-a ales temperatura de 66°C ca fiind cea optimă de legare a primerilor HindIII6hlnofw și KpnI6hlnorev. De asemenea, concentrația de MgCl₂ a fost stabilită, în mod empiric, la 2 mM, deoarece această concentrație a produs rezultate scontate, ea fiind utilizată pe parcursul tuturor experimentelor ce au avut ca scop amplificarea genei *6hln0*.

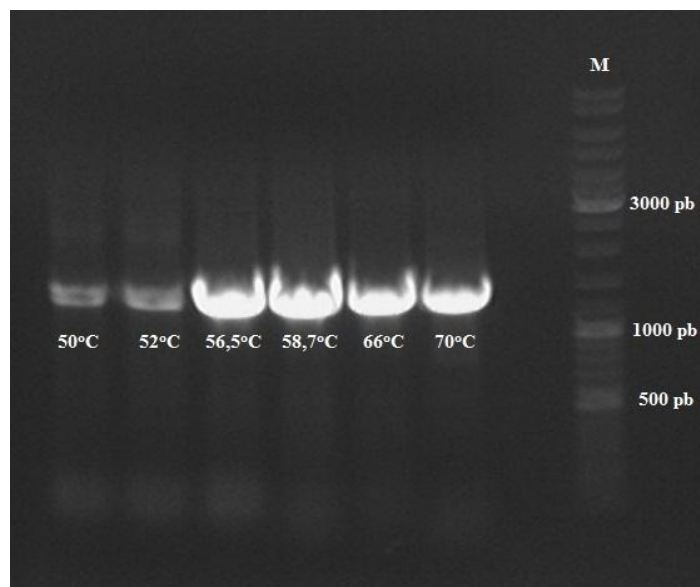


Figura 21. Migrarea electroforetică a genei *bhlno*, amplificată în gradient de temperatură; ca matriță de ADN s-a folosit suspensie celulară de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

Concentrația de $MgCl_2$ reprezintă un alt factor ce poate influența decisiv reacția de amplificare. Datorită legării ionilor de Mg^{2+} la moleculele de dNTP-uri, primeri și ADN-matriță, concentrația ionilor de Mg^{2+} trebuie să fie optimizată pentru a obține un randament maxim în reacția de amplificare. Conform fișei tehnice a enzimei Taq ADN polimeraza (Thermo Scientific, n.d.), intervalul recomandat pentru concentrația de $MgCl_2$ trebuie să fie cuprins între 1 și 4 mM. Dacă concentrația de ioni de Mg^{2+} este prea mică, randamentul reacției PCR ar putea fi redus, iar dacă concentrația este prea mare, amplificarea PCR ar putea deveni nespecifică.

În cazul genei *sad*, a fost necesară stabilirea unei concentrații optime de $MgCl_2$ pentru a obține un randament de amplificare cât mai mare și o specificitate cât mai bună. Din acest motiv, s-au testat diverse concentrații de $MgCl_2$. În patru microeprubete de PCR a fost adăugat amestecul de reacție și soluția stoc de $MgCl_2$ 25 mM conform indicațiilor din tabelul 8, creându-se astfel un gradient de concentrație. Pentru toate concentrațiile testate, temperatura de legare a oligonucleotidelor amorsă folosită a fost aleasă în mod empiric ca fiind 56,5°C.

Tabel 8. Volumele de $MgCl_2$ 25 mM, necesare pentru obținerea concentrațiilor finale dorite în amestecul de reacție

Concentrația finală de $MgCl_2$ (mM)	1	2	3	4
Volumul de $MgCl_2$ 25 mM care urmează să fie adăugat pentru 25 μ l amestec de reacție (μ l)	1	2	3	4

După finalizarea programului PCR, produsul a fost amestecat cu soluție tampon de încărcare 6X și introdus în godeurile unui gel de agaroză respectând ordinea menționată în tabelul 9.

Tabel 9. Ordinea de încărcare a produsului amplificat (gena *sad*) în gelul de agaroză

	Marker	1	2	3	4
Soluție tampon de încărcare 6X (μl)	3	3	3	3	3
Soluție PCR (μl)	X	15	15	15	15

În figura 22, se poate observa că odată cu creșterea concentrației de $MgCl_2$ în amestecul de reacție, amplificarea devine nespecifică. Din acest motiv, pentru amplificarea genei *sad* s-a preferat concentrația de 1 mM unde, amplificarea a fost specifică dar randamentul reacției a fost destul de redus. Temperatura de legare a oligonucleotidelor amorsă utilizată pentru amplificarea genei *sad* a fost stabilită, în mod empiric, la $56,5^\circ C$ și a fost utilizată pe parcursul tuturor experimentelor ce au avut ca scop amplificarea acestei gene.

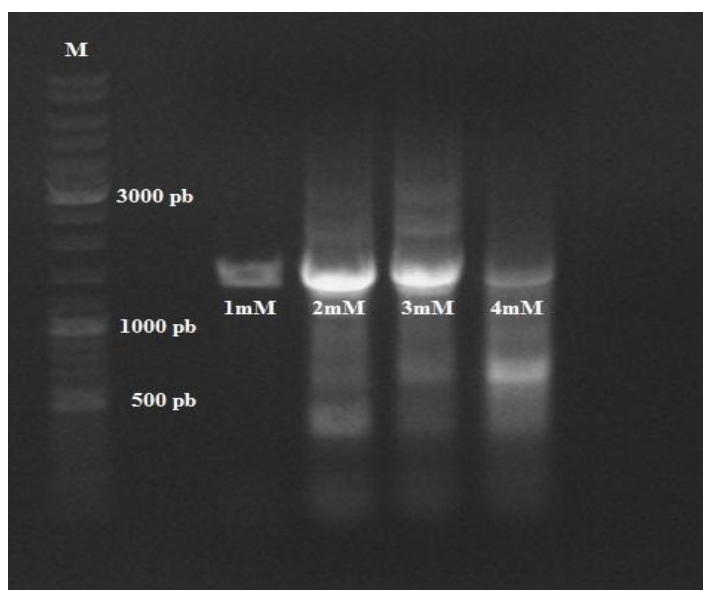


Figura 22. Migrarea electroforetică a genei *sad*, amplificată în gradient de concentrație de $MgCl_2$; ca matriță de ADN s-a folosit suspensie celulară de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

IV.5. Evaluarea prezenței genelor *6hln0* și *sad* în AK-YN10

Genele *6hln0* și *sad* sunt localizate pe plasmidul pAO1 al tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* și sunt implicate în realizarea căii de degradare a nicotinei. Prezența acestor gene a fost evaluată prin PCR în tulpina AK-YN10 și totodată s-a identificat locația acestora (plasmidial sau cromozomial).

După stabilirea celor trei condiții optime (temperatura de legare a primerilor, concentrația de MgCl₂ și timpul alocat etapei de sinteză), prezența genei *6hln0* în tulpinile *Arthrobacter* sp. AK-YN10 și *A. nicotinovorans* pAO1 a fost evaluată prin PCR. Pentru amplificarea acestei gene, în șase microprubete s-a preparat un volum de 25 μl de amestec de reacție conform tabelului 10. În amestecul de reacție s-a păstrat concentrația de 2 mM de MgCl₂ stabilită anterior, în mod empiric. Pentru a identifica locația genei, aceasta a fost amplificată din trei surse diferite de ADN obținute de la cele două tulpini utilizate în acest studiu: suspensie celulară, ADN total obținut din celule și ADN plasmidial purificat din gelul de agaroză. Sursa de ADN provenită din tulpina AK-YN10 a fost introdusă în microprubetele 1-3, iar în tuburile 4-6 s-a adăugat ADN-ul original din *A. nicotinovorans* pAO1.

Tabel 10. Compoziția amestecului de reacție pentru amplificarea genei *6hln0*

Număr microprubetă	1	2	3	4	5	6	
Apă distilată sterilă	17,5 μl	17,5 μl	17 μl	17,5 μl	17,5 μl	17 μl	
Tampon PCR 10X (+KCl, -MgCl ₂)	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	
dNTP (10 mM)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	
HindIII6hlnofw (11,8 pmol/μl)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	
KpnI6hlnorev (6,6 pmol/μl)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	
ADN-matriță	Suspensie celulară	0,5 μl	X	X	0,5 μl	X	X
	Soluție ADN total	X	0,5 μl	X	X	0,5 μl	X
	Soluție ADN plasmidial	X	X	1 μl	X	X	1 μl
ADN-polimeraza Taq*	0,5 μl						

*- s-a adăugat în etapa Hot-Start

Pentru amplificarea secvenței de 1277 pb a genei *6hln0*, programul termociclorului a fost setat respectând indicațiile din subcapitolul III.4., cu mențiunea că: temperatura utilizată în etapa de legare a primerilor a fost de 66°C, iar timpul alocat etapei de sinteză a fost setat la

2 minute. În urma amplificării, produsul a fost încărcat în godeurile gelului de agaroză în ordinea indicată în tabelul 11.

Tabel 11. Ordinea de încărcare în gel a produsului PCR (gena *6hln0*)

	1	2	3	Marker	4	5	6
Soluție tampon de încărcare 6X (μl)	3	3	3	3	3	3	3
Soluție PCR (μl)	15	15	15	X	15	15	15

În figura 23, se poate observa că amplificarea genei *6hln0* a avut succes în cazul tuturor matrițelor de ADN utilizate. Gena este implicată în metabolismul nicotinei și este localizată pe plasmidul pAO1 al tulpinii *A. nicotinovorans* pAO1. Banda corespunzătoare fragmentului amplificat a fost identificată în câmpul 6 unde s-a folosit ca matriță ADN-ul plasmidial al tulpinii *A. nicotinovorans* pAO1, însă locația acestei gene a fost stabilită în studiile anterioare (Mihășan, 2011). De asemenea, prezența benzii corespunzătoare fragmentului amplificat în câmpul 3, unde s-a folosit ca matriță ADN-ul plasmidial obținut din celulele tulpinii AK-YN10, sugerează faptul că gena *6hln0* prezentă pe plasmidul pAO1 este totodată localizată pe un plasmid în tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10.

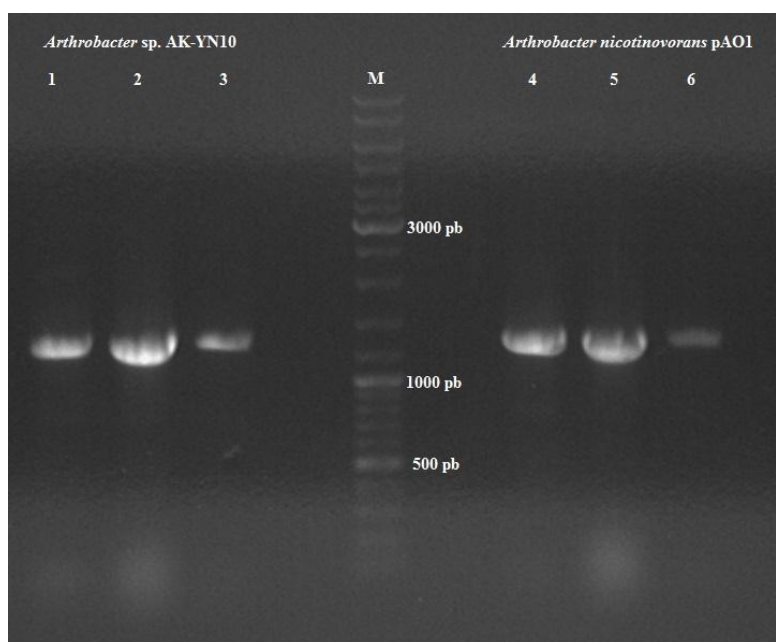


Figura 23. Migrarea în gelul de agaroză a fragmentului amplificat (*6hln0*) utilizând ca matrițe de ADN suspensie celulară, ADN total și ADN plasmidial din AK-YN10 (1, 2 și 3) și *A. nicotinovorans* pAO1 (4, 5 și 6)

În mod similar, și prezența genei *sad* a fost evaluată prin PCR în cele două sușe de *Arthrobacter*. În șase microeprubete a fost repartizat un volum de 25 μl de amestec de reacție preparat după indicațiile din tabelul 12. În amestecul de reacție s-a păstrat concentrația de 1

mM de MgCl₂, stabilită anterior ca fiind cea optimă pentru amplificarea genei *sad* și s-au adăugat aceleași matrițe de ADN ca și în cazul amplificării genei *6hln0*. Sursa de ADN provenită din tulpina *A. nicotinovorans* pAO1 a fost introdusă în microeprubetele 1-3, iar în tuburile 4-6 s-a adăugat ADN-ul original din AK-YN10.

Tabel 12. Compoziția amestecului de reacție pentru amplificarea genei *sad*

Număr microeprubetă	1	2	3	4	5	6	
Apă distilată sterilă	19 μl	19 μl	18,5 μl	19 μl	19 μl	18,5 μl	
Tampon PCR 10X (+KCl, -MgCl ₂)	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	
dNTP (10 mM)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	
SDHBamHIfor (9 pmol/μl)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	
SDHXhoIrev (13 pmol/μl)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	
ADN-matriță	Suspensie celulară	0,5 μl	X	X	0,5 μl	X	X
	Soluție ADN total	X	0,5 μl	X	X	0,5 μl	X
	Soluție ADN plasmidial	X	X	1 μl	X	X	1 μl
ADN-polimeraza Taq*	0,5 μl						

*- s-a adăugat în etapa Hot-Start

Pentru amplificarea secvenței de 1353 pb a genei *sad*, valoarea temperaturii din etapa de legare a primerilor a fost setată la 56,5°C, iar timpul alocat etapei de sinteză a fost setat la 2 minute. Produsul rezultat în urma amplificării a fost încărcat în godeurile unui gel de agaroză (tabel 13).

Tabel 13. Ordinea de încărcare în gel a produsului PCR (gena *sad*)

	1	2	3	Marker	4	5	6
Soluție tampon de încărcare 6X (μl)	3	3	3	3	3	3	3
Soluție PCR (μl)	15	15	15	X	15	15	15

În urma separării electroforetice a produsului PCR, a fost identificată o singură bandă corespunzătoare fragmentului amplificat în godeul numărul 1, acolo unde, s-a folosit suspensie celulară de *A. nicotinovorans* pAO1 în calitate de matriță de ADN (figura 24). De asemenea, lipsa benzilor din godeurile 2 și 3 (unde s-au folosit ADN total și respectiv ADN plasmidial de *A. nicotinovorans* pAO1 ca matrițe de ADN), sugerează faptul că reacția PCR a fost un eșec, întrucât gena *sad* este localizată pe plasmidul pAO1. Din acest motiv, prezența

genei *sad* în AK-YN10 nu a putut fi confirmată și de asemenea, locația acesteia nu a fost stabilită.

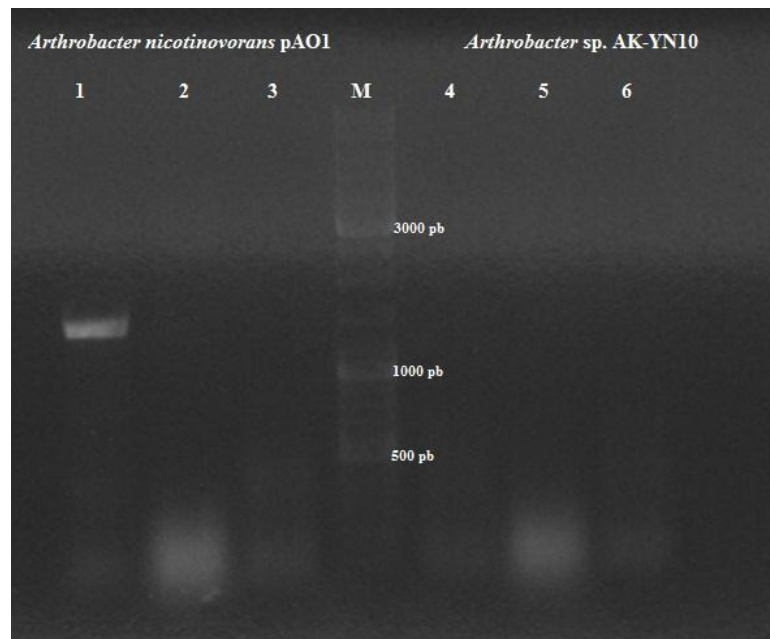


Figura 24. Migrarea în gelul de agaroză a fragmentului amplificat (*sad*) utilizând ca matrițe de ADN suspensie celulară, ADN total și ADN plasmidial din *A. nicotinovorans* pAO1 (1, 2 și 3) și AK-YN10 (4, 5 și 6)

CONCLUZII

Din celulele tulpinilor *A. nicotinovorans* pAO1 și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 s-au obținut preparate de ADN total bogate în ADN plasmidial. ADN-ul total a fost separat prin electroforeză în geluri de agaroză și s-au identificat benzile corespunzătoare ADN-ului genomic și a ADN-ului plasmidial. Identificarea benzilor de ADN plasmidial sugerează faptul că în celulele de *Arthrobacter* sp. AK-YN10 este prezent cel puțin un plasmid.

Benzile corespunzătoare ADN-ului plasmidial au fost excizate din gel și ADN-ul a fost purificat, însă cu un randament extrem de scăzut.

Genele *6hln* și *sad* au fost amplificate utilizându-se suspensie celulară, ADN total și plasmidial de *A. nicotinovorans* pAO1 și *Arthrobacter* sp. AK-YN10 ca matrițe de ADN. Pentru amplificarea genei *6hln*, s-a folosit o concentrație de MgCl₂ de 2 mM (stabilită în mod empiric) și o temperatură optimă de legare a primerilor de 66°C. În cazul genei *sad*, temperatura de legare a primerilor a fost stabilită în mod empiric la 56,5°C, iar concentrația de MgCl₂ utilizată a fost de 1 mM. Pentru fiecare genă amplificată, durata etapei de sinteză a fost setată la 2 minute.

În urma amplificării, s-a demonstrat faptul că gena *6hln* care codifică o enzimă cheie implicată în metabolismul nicotinei pe megaplasmidul pAO1 este, totodată, localizată și pe plasmidul necunoscut din tulpina *Arthrobacter* sp. AK-YN10. Prezența genei *sad* în *Arthrobacter* sp. AK-YN10 nu a putut fi confirmată.

VI. ANEXE – Fotografiiile gelurilor obținute în cadrul acestui studiu

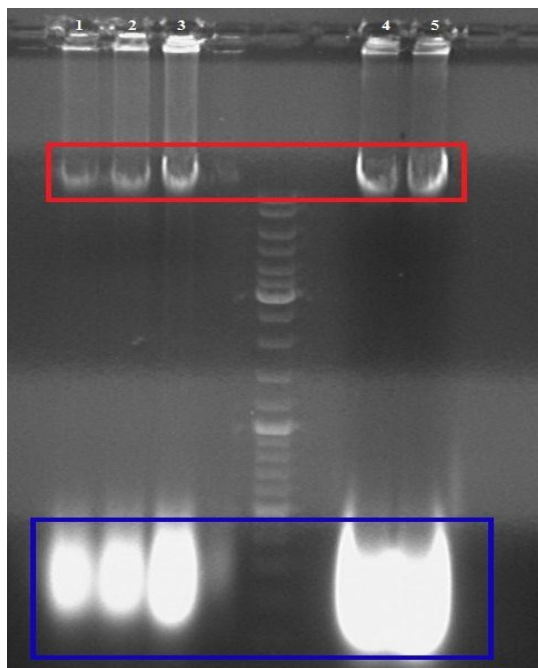


Figura 25. Separarea electroforetică în gelul de agaroză a ADN-ului total obținut din celulele de AK-YN10 (1-3) și *A. nicotinovorans* pAO1 (4-5). Benzile de ADN plasmidial sunt încadrate cu roșu și cele de ADN genomic, sunt încadrate cu albastru

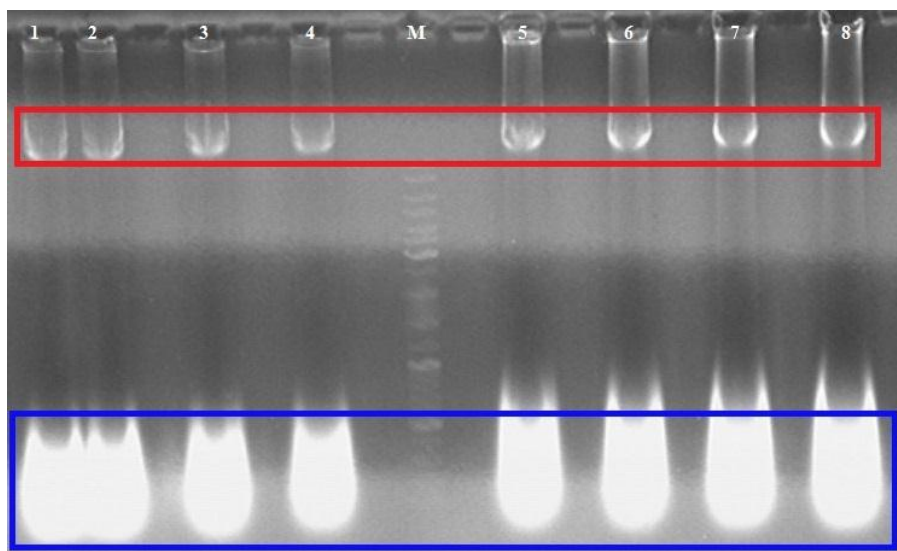


Figura 26. Separarea electroforetică în gelul de agaroză a ADN-ului total obținut din celulele de AK-YN10 (1-4) și *A. nicotinovorans* pAO1 (5-8). Benzile de ADN plasmidial sunt încadrate cu roșu și cele de ADN genomic, sunt încadrate cu albastru

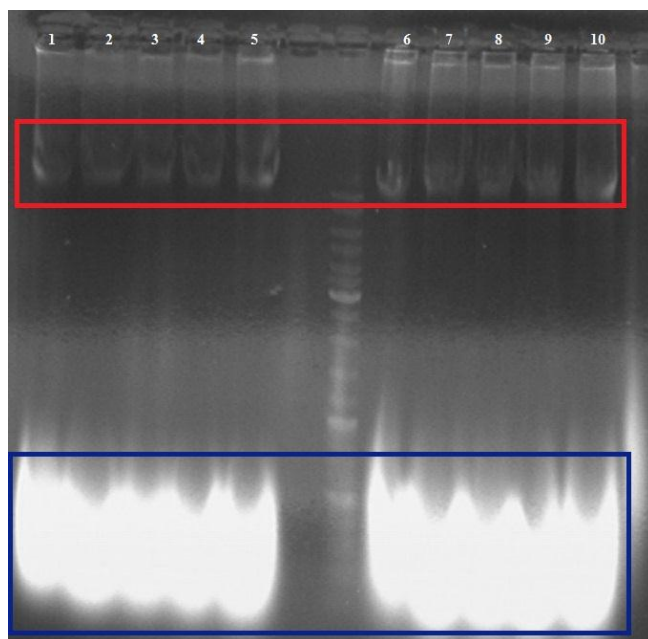


Figura 27. Separarea electroforetică în gelul de agaroză a ADN-ului total obținut din celulele de AK-YN10 (1-5) și *A. nicotinovorans* pAO1 (6-10). Benzile de ADN plasmidial sunt încadrate cu roșu și cele de ADN genomic, sunt încadrate cu albastru

BIBLIOGRAFIE

1. **Aaij, C., Borst, P.** (1972): The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 269(2), 192–200.
2. **Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., Beatson, S. A.** (2011): *BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons*. *BMC Genomics*, 12(1), 402.
3. **Anderson, D. G., McKay, L. L.** (1983): *Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 46(3), 549–552.
4. **Armstrong, A. J., Schultz, R. J.** (2008): Agarose gel electrophoresis. In *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* (pp. 7.2.1-7.2.3). John Wiley & Sons, Inc.
5. **Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, A. J., Struhl, K.** (2002): *Short Protocols in Molecular Biology*, (pp. 1.23-1.27). John Wiley & Sons, Inc.
6. **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... Zagnitko, O.** (2008): *The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology*. *BMC Genomics*, 9(1), 75.
7. **Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979): *A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA*. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513–1523.
8. **Boiangiu, R., Mihășan, M.** (2015): *Teză de licență - Cromatografia de înaltă performanță în mediu lichid (HPLC) pentru separarea unor derivați metabolici din *Arthrobacter nicotinovorans**. Alexandru Ioan Cuza University of Iasi.
9. **Borodina, E., Kelly, D. P., Schumann, P., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Wood, A. P.** (2002): *Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov.* *Archives of Microbiology*, 177(2), 173–183.
10. **Boylen, C. W.** (1973): *Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation*. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 33–7.
11. **Brandsch, R.** (2006): *Microbiology and biochemistry of nicotine degradation*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5), 493–498.
12. **Busse H. J., Wieser, M.** (2014): The Genus *Arthrobacter*. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 105–132). Berlin,

Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

13. **Calladine, C. R., Collis, C. M., Drew, H. R., Mott, M. R.** (1991): *A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels*. *Journal of Molecular Biology*, 221(3), 981–1005.
14. **Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., Parkhill, J.** (2005): *ACT: the Artemis comparison tool*. *Bioinformatics*, 21(16), 3422–3423.
15. **Chiribau, C. B., Mihășan, M., Ganas, P., Igloi, G. L., Artenie, V., Brandsch, R.** (2006): *Final steps in the catabolism of nicotine*. *The FEBS Journal*, 273(7), 1528–1536.
16. **Chomzynski, P., Sacchi, N.** (1987): *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction*. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
17. **Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., ... Tiedje, J. M.** (2009): *The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis*. *Nucleic Acids Research*, 37(7), 141–145.
18. **Dunca, S., Nimițan, E., Ailiesei, O., Ștefan, M.** (2007): Tehnica examinării caracterelor morfologice și tinctoriale ale bacteriilor. In *Microbiologie aplicată* (pp. 70–76). Iași: Casa Editorială Demiurg Plus.
19. **Eberwein, H., Gries, F. A., Decker, K.** (1961): *[On the decomposition of nicotine by bacterial enzymes. II. Isolation and characterization of a nicotine-splitting soil bacterium]*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 323, 236–248.
20. **Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Balkwill, D. L., Kennedy, D., Li, S. W., Kostandarithes, H. M., ... Brockman, F. J.** (2004): *Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4230–41.
21. **Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A., Wagner, D.** (2011): *Arthrobacter livingstonensis sp. nov. and Arthrobacter cryotolerans sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 979–984.
22. **Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... Gallipeau, S.** (2010): *Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (Xenopus laevis)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4612–7.
23. **Henne, K. L., Nakatsu, C. H., Thompson, D. K., Konopka, A. E., Jones, D., Keddie,**

- R., ... Morais, P.** (2009): *High-level chromate resistance in Arthrobacter sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes*. BMC Microbiology, 9(1), 199.
- 24. Hervet, H., Bean, C. P.** (1987): *Electrophoretic mobility of λ phage HIND III and HAE III DNA fragments in agarose gels: A detailed study*. Biopolymers, 26(5), 727–742.
- 25. Holmes, D. S., Quigley, M.** (1981): *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*. Analytical Biochemistry, 114(1), 193–7.
- 26. Igloi, G. L., Brandsch, R.** (2003): *Sequence of the 165-Kilobase Catabolic Plasmid pAO1 from Arthrobacter nicotinovorans and Identification of a pAO1-Dependent Nicotine Uptake System*. Journal of Bacteriology, 185(6), 1976–1986.
- 27. Israil, A. M.** (2000): *Biologie moleculară*, (pp. 312-313). București: Humanitas.
- 28. Jerke, K., Nakatsu, C. H., Beasley, F., Konopka, A.** (2008): *Comparative analysis of eight Arthrobacter plasmids*. Plasmid, 59(2), 73–85.
- 29. Kallimanis, A., LaButti, K. M., Lapidus, A., Clum, A., Lykidis, A., Mavromatis, K., ... Kyrpides, N.** (2011): *Complete genome sequence of Arthrobacter phenanthrenivorans type strain (Sphe3)*. Standards in Genomic Sciences, 4(2), 123–130.
- 30. Keddie, R. M., Collins, M. D., Jones, D.** (1986): Genus Arthrobacter. In *Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 2* (pp. 1288–1300).
- 31. Keddie, R. M., Jones, D.** (2006): The Genus Arthrobacter. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 945–960). New York, NY: Springer New York.
- 32. Kirkpatrick, F. H.** (1990): *Overview of agarose gel properties*. Current Communications in Cell & Molecular Biology, 1, 9-22.
- 33. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H. G.** (1971): *Studies on polynucleotides*. Journal of Molecular Biology, 56(2), 341–361.
- 34. Lalande, M., Noolandi, J., Turmel, C., Rousseau, J., Slater, G. W.** (1987): *Pulsed-field electrophoresis: application of a computer model to the separation of large DNA molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84(22), 8011–5.
- 35. Loveland-Curtze, J., Sheridan, P. P., Gutshall, K. R., Brenchley, J. E.** (1999): *Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the Arthrobacter subgroup and description of Arthrobacter psychrolactophilus, sp. nov.* Archives of Microbiology, 171(6), 355–363.
- 36. McDonell, M. W., Simon, M. N., Studier, F. W.** (1977): *Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in*

- neutral and alkaline gels*. Journal of Molecular Biology, 110(1), 119–146.
- 37. Megharaj, M., Avudainayagam, S., Naidu, R.** (2003): *Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste*. Current Microbiology, 47(1), 51–4.
- 38. Mihășan, M.** (2011): *Megaplasmidul pAOI+ - Structură și Funcție*, (pp. 9-77). Editura Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași.
- 39. Mihășan, M.** (2016): *Habilitation thesis - Arthrobacter nicotinovorans - new insights into its metabolism , molecular evolution and biotechnological applications*, Alexandru Ioan Cuza University of Iași.
- 40. Mihășan, M., Brandsch, R.** (2013): *pAOI of arthrobacter nicotinovorans and the spread of catabolic traits by horizontal gene transfer in gram-positive soil bacteria*. Journal of Molecular Evolution, 77(1–2).
- 41. Mihășan, M., Ștefan, M., Olteanu, Z.** (2012): *Biologie Moleculară*, (pp. 73-176) Iași: Editura Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași.
- 42. Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., ... Sadowsky, M. J.** (2006): *Secrets of Soil Survival Revealed by the Genome Sequence of Arthrobacter aurescens TC1*. PLoS Genetics, 2(12), e214.
- 43. Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J. F., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., ... Vallaëys, T.** (2010): *The Arthrobacter arilaitensis Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese*. PLoS ONE, 5(11), e15489.
- 44. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1986): *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51 Pt 1, 263–73.
- 45. Niewerth, H., Schuldes, J., Parschat, K., Kiefer, P., Vorholt, J. A., Daniel, R., ... Boll, M.** (2012): *Complete genome sequence and metabolic potential of the quinaldine-degrading bacterium Arthrobacter sp. Rue61a*. BMC Genomics, 13(1), 534.
- 46. Nordin, K., Unell, M., Jansson, J. K.** (2005): *Novel 4-Chlorophenol Degradation Gene Cluster and Degradation Route via Hydroxyquinol in Arthrobacter chlorophenicus A6*. Applied and Environmental Microbiology, 71(11), 6538–6544.
- 47. Norton, I. T., Goodall, D. M., Austen, K. R. J., Morris, E. R., Rees, D. A.** (1986): *Dynamics of molecular organization in agarose sulphate*. Biopolymers, 25(6), 1009–1029.
- 48. Popescu, A.** (2012): *Dicționar de genetică moleculară și inginerie genetică*, (pp. 83-84). Cluj-Napoca: AcademicPres.

- 49. Radloff, R., Bauer, W., Vinograd, J.** (1967): *A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 57, 1514–21.
- 50. Richard, R. J.** (2004): *Analysis of Genes and Genomes*, (pp. 89-98). John Wiley and Sons.
- 51. Sagarkar, S., Bhardwaj, P., Storck, V., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., Kapley, A.** (2016): *s-triazine degrading bacterial isolate Arthrobacter sp. AK-YN10, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil*. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(2), 903–13.
- 52. Sagarkar, S., Bhardwaj, P., Yadav, T. C., Qureshi, A., Khardenavis, A., Purohit, H. J., Kapley, A.** (2014): *Draft genome sequence of atrazine-utilizing bacteria isolated from Indian agricultural soil*. Genome Announcements, 2(1), e01149-13.
- 53. Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1986): *Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature, 324(6093), 163–166.
- 54. Sambrook, J.** (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (pp. 1.31-1.59). Spring Harbor Laboratory Press.
- 55. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Spring Harbor Laboratory Press.
- 56. Sandu, C., Chiribau, C. B., Sachelaru, P., Brandsch, R.** (2005): *Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in Arthrobacter nicotinovorans and other arthrobacter species*. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8920–8924.
- 57. Schleifer, K. H., Kandler, O.** (1972): *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriological Reviews, 36(4), 407–477.
- 58. Schwartz, D. C., Cantor, C. R.** (1984): *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, 37(1), 67–75.
- 59. Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J.** (1973): *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis*. Biochemistry, 12(16), 3055–3063.
- 60. Slater, G. W., Mayer, P., Drouin, G.** (1996): *Migration of DNA through gels*. Methods in Enzymology, 270, 272–295.
- 61. Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L.** (1997): *Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov.* International Journal of

- Systematic Bacteriology, 47(2), 479–491.
- 62. Thermo Scientific** (n.d.). *Taq DNA Polymerase (recombinant)*. Accesat pe 19.05.2017: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012027_TaqDNAPolymerase_recombinant_5_UuL_500U_UG.pdf
- 63. Thorne, H. V.** (1966): *Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA*. Virology, 29(2), 234–239.
- 64. Vogelstein, B., Gillespie, D.** (1979): *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(2), 615–619.
- 65. Westerberg, K., Elvang, A. M., Stackebrandt, E., Jansson, J. K.** (2000): *Arthrobacter chlorophenolicus sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(6), 2083–2092.
- 66. Zymo Research** (n.d.): *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*. Accesat pe 1.06.2017 de pe pagina: <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/34/d4001i.pdf>

LUCRĂRI PUBLICATE/PREzentATE ÎN URMA ACESTUI STUDIU

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;