



Praca-licencjacka-wzor-168

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii

Pierwsza strona pracy musi

być zgodna z

rozporządzeniem rektora i

wyglądać mniej więcej tak.

Nie wstawia się orszów,

znaczków, poziomych linii i

innych upiększeń

Piotr Stawiński

Nr albumu: 209497

Poszukiwanie funkcjonalnych elementów

transpozycyjnych

w *Paracoccus sulfuroxidans* JCM 14013 oraz *Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588

Praca licencjacka

na kierunku BIOLOGIA

Tutaj jest drobne odstąpienie od normy: dziekan Wydziału Biologii pozwala na umieszczenie informacji o zakładzie i instytucie na stronie tytułowej

Praca wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. Mirosławy Włodarczyk

Instytut Mikrobiologii

Zakład Genetyki Bakterii

Ten dokument, podobnie jak wszystkie
Czerwiec 2009 prace dyplomowe, jest chroniony prawem autorskim

Oświadczenie kierującego pracą

Potwierdzam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i kwalifikuje się do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data
Strony zgodne z
rozporz"dzieniem
rektora.

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data Podpis autora pracy

Ta strona musi być!

zgodna z

rozporządzeniem

rektora

Streszczenie

Przeprowadzono wstępną analizę szczepów *P. sulfuroxidans* JCM14013 oraz *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588, w trakcie której ustalono optymalne warunki wzrostu tych bakterii, określono ich wrażliwość na różne antybiotyki oraz zidentyfikowano naturalne plazmidy. Do obu szczepów wprowadzono koniugacyjnie plazmidy pułapkowe pMEC1 i pMAT1, które umożliwiają identyfikację funkcjonalnych elementów (nie)transpozycyjnych. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano w *P. zeaxanthinifaciens* nową sekwencję insercyjną,

którą w wyniku dalszych analiz zaklasyfikowano do rodziny IS5, grupy IS427. Nową sekwencję nazwano ISPze1. Zastosowanie pMAT1 w *P. sulfuroxidans* nie doprowadziło do identyfikacji elementu transpozycyjnego.

Słowa kluczowe

Słowa kluczowe w ilości 8-10,

Paracoccus sulfuroxidans, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, element transpozycyjny, IS, laszjesam, pMAT1, pMEC1, sekwencja insercyjna, wektor pułapki powiadawczej. Te same umieć w APD.

Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

13.1 – Biologia

Dziedzina pracy, kody

musisz „skąd wzięty”!

(znaleźć na stronie)

Tytuł pracy w języku angielskim

Search for functional transposable elements in *Paracoccus sulfuroxidans* JCM 14013 and *Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588

!#\$%&'()*%&)

+,-./0,1023453.678923;:<53=>

70.453?@345?4A.9?+?@.9-7B.:B<?40458.1?C:501@73D.5.9E0458.9-0@B

F.G0HI J0K8;7?:5.LOM?;5<?:5>

70.:N0-@53.+3

9-?PI F.G0HI /5-?;Q0:53.RQ?10-@7B<>

Strona podzi#kowa% i

dedykacji. Jedna strona pracy,

któr" mo&na zagospodarowa!

w\$a'ciwie dowolnie. Zwykle w

procesie pisania pracy

dyplomowej bierze udzia\$)wiele

osób a autor jest jeden. To

w\$a'ciwie miejsce do

podzi#kowania za ich prac#.

-BO?-B@743.5.9?+?@.:.9E0458.9-0@B

70.?953<S.9-?+?O?-><A

131B<8=S

T\$)UVW%

Spis tre'ci powinien by!

umieszczony w pracy.

Pami#taj o tym, &e strony

pracy musz" by!

numerowane. Je'li chcesz:

umie'! te& spis tabel i

rysunków.

Spis treści

1. Wstęp	5
----------------	---

1.1.	Ruchome elementy genetyczne	5
1.2.	Sekwencje insercyjne	5
1.2.1.	Klasyfikacja sekwencji insercyjnych	6
1.3.	Identyfikacja elementów transpozycyjnych	8
2.	Cel pracy	10
3.	Materiały	11
3.1.	Szczepy i plazmidy bakteryjne	11
3.2.	Podłoża	13
3.3.	Roztwory i bufony	14
3.4.	Enzymy	15
3.5.	Zestawy odczynników	15
3.6.	Odczynniki i ich pochodzenie	15
3.7.	Wzorzec wielkości DNA	15
4.	Metody	16
4.1.	Warunki hodowli	16
4.2.	Metody wprowadzania plazmidów do komórek bakteryjnych	16
4.2.1.	Koniugacja trójrodzicielska	16

4.2.2. Transformacja
17
4.3.
Izolacja, obróbka i analiza DNA
17

4.3.1.
Izolacja plazmidowego DNA w małej skali
17

4.3.2. Izolacja plazmidowego DNA w dużej skali i jego oczyszczanie

poprzez ultrawirowanie w gradiencie chlorku cezu z bromkiem

etydyny
17

4.3.3.
Izolacja i elektroforeza wielkocząsteczkowego DNA
18

4.3.4.
Izolacja całkowitego DNA
18

4.3.5. Izolacja i wizualizacja plazmidowego DNA poprzez ekstrakcję

mieszaniną fenol:chloroform
19

4.3.6.
Elektroforeza drobnocząsteczkowego DNA
19

4.3.7.
Enzymatyczna obróbka DNA
19

4.3.8.
Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego
19

4.4.
Amplifikacja DNA w reakcji PCR
19

19	
4.5.	
Sekwencjonowanie DNA	
20	
4.6.	
Analizy bioinformatyczne sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej . .	
20	
4.7.	
Hybrydyzacja DNA-DNA oraz immunodetekcja wyznakowanego DNA .	21
4.7.1.	
Znakowanie sondy	
21	
2	
4.7.2.	
Transfer DNA na membranę nylonową	
21	
4.7.3.	
Hybrydyzacja DNA-DNA	
22	
4.7.4.	
Immunodetekcja utworzonych dupleksów	
22	
5.Wyniki	23
5.1. Wstępna charakterystyka szczepów <i>P. sulfuroxidans</i> JCM 14013 i <i>P. ze-</i>	
<i>axanthinifaciens</i> ATCC 21588	23
5.1.1. Ustalenie optymalnych warunków wzrostu badanych szczepów	
bakterii	
24	
5.1.2.	
Identyfikacja plazmidów	
24	
5.1.3.	
Badanie wrażliwości szczepów na wybrane antybiotyki	
25	
5.2.	

Identyfikacja elementów transpozycyjnych (TE) obecnych w genomie

P. sulfuroxidans PSF1 i P. zeaxanthinifaciens PZX1

28

5.2.1.

Zasada działania wektorów pułapkowych

28

5.2.2.

Identyfikacja TE w P. sulfuroxidans PSF1

30

5.2.3.

Identyfikacja TE w P. zeaxanthinifaciens PZX1

31

5.3.

Analiza potencjalnych mutantów insercyjnych P. zeaxanthinifaciens PZX1

uzyskanych za pomocą wektora pMEC1

32

5.3.1. Określenie miejsca docelowego transpozycji zidentyfikowanego

TE w obrębie kasety selekcyjnej *cl-tetA*

32

5.3.2.

Ustalenie sekwencji nukleotydowej zidentyfikowanego TE

33

5.3.3. Badanie występowania ISPze1 w puli mutantów insercyjnych

pMEC1

34

5.4.

Analiza bioinformatyczna sekwencji insercyjnej ISPze1

34

5.4.1.

Analiza sekwencji nukleotydowej ISPze1

34

5.4.2.

Analiza porównawcza sekwencji ISPze1 z pokrewnymi sekwen-

cjami insercyjnymi

37

5.5. Określenie liczby kopii sekwencji insercyjnej ISPze1 w genomie *P. ze-*

axanthinifaciens PZX1

40

5.6. Rozpowszechnienie ISPze1 w genomach innych bakterii z rodzaju *Para-*

coccus

41

6. Dyskusja

43

Skróty i symbole

umieszczamy w tym

miejscu lub na ko%cu

pracy.

Spis skrótów i symboli

Skrót

Opis

Strona

DDE

centrum katalityczne zbudowane z trzech aminokwasów o

6

symbolach: D, D oraz E

DIG
dioksygenina
34

DR
proste powtórzenia sekwencji docelowej (ang. Direct Repeats)
6

F
podłoże F
13

Frame-shift
programowa zmiana ramki odczytu (ang. frame-shift)
6

IHF
bakteryjny czynnik integracji (ang. Integration Host Factor)
37

IR
sekwencje odwrócone, flankujące IS (ang. Inverted Repeats)
5

IRL
jeden z IR
35

IRR
jeden z IR
35

LA
Staraj si# unika!
13

podłoże LA

LB
samotnych liter na
13

podłoże LB

IS
ko%cu linii
5

sekwencja insercyjna (ang. Insertion Sequence)

MGE
ruchomy element genetyczny (ang. Mobile Genetic Element)
5

ORF
otwarta ramka odczytu (ang. Open Reading Frame)
6

TE
element transpozycyjny (ang. Transposable Element)
5

4

Pracę piszemy czcionką "szeryfową" (np. Times New Roman) wielkością np. 12 pt (zarządzenie rektora nic o tym nie mówi). Często stosuje się interlinię 1,5 (w tej pracy: nie zastosowano). Przy składowaniu dwustronnym wewnętrzny margines powinien być większy, przy składowaniu jednostronnym: lewy margines (ma to znaczenie gdy spinamy pracę). Przy składowaniu dwustronnym: Nowy rozdział powinien zaczynać się na „prawej stronie” (w razie potrzeby zostawiamy pustą stronę). Nie używaj (niepotrzebnie) kolorów, zmieniających się czcionek itp., praca powinna być prosta i czytelna.

Rozdział 1

Wstęp

Poszczególne

rozdziały i sekcje

powinny być

numerowane

1.1. Ruchome elementy genetyczne

Ruchome elementy genetyczne (MGE; ang. Mobile Genetic Elements) są składnikiem niemal wszystkich genomów prokariotycznych. Są one zdolne do przenoszenia bardzo zróżnicowanej informacji genetycznej między komórkami nawet odległymi filogenetycznie bakterii. Wzbogacają tym samym pulę mobilnego DNA uczestniczącego

w horyzontalnym transferze genów. Większość z nich koduje różnego typu rekombinazy, Wyliczanie w tekście

których Wprowadzenie aktywności umożliwi skrót „tasowanie” informacji genetycznej w obrębie jednego, bądź między różnymi replikonami występującymi w komórce. Są one zatem ważnym czynnikiem kształtującym strukturę genomów bakterii, a ich rola w ewolucji bakterii jest bardzo znacząca.

Ruchome elementy genetyczne stanowią niezwykle heterogenną grupę. Poszczególne MGE mają zarówno odmienną strukturę genetyczną, jak i różne mechanizmy zapewniające im mobilność. Wśród MGE wyróżnia się: (i) elementy transpozycyjne (TE; ang. Transposable Element), (ii) plazmidy, (iii) bakteriofagi, (iv) kasety genowe inte-gronów oraz (v) elementy koniugacyjne integrujące z DNA (ICE; ang. Integrative and

Conjugative Element).

Cytowanie w pracy to

temat rzeka. W tej Najlicniejszą grupę MGE stanowią elementy transpozycyjne, występujące po-został przy#tywsze nietyl zarówno w genomach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Charaktery-

cytowania pozuj nazwiskach: są one zdolnością do przemieszczania się w genomie (w obrębie jednego replikonu,

*jeśli jest jeden autor: między różnymi współwystępującymi replikonami) na drodze transpozycji, która

Autor, Rok; je jest li dwóch: rodzajem rekombinacji nieuprawnionej. Do elementów transpozycyjnych zalicza Autor & Autor, się Rok; se w encje li insercyjne (IS, ang. Insertion Sequence) oraz transpozony (Tn), wśród trzech: Autor których wyród et al., Rok, zni się transpozony złożone i niezłożone. Elementy transpozycyjne wystę-

wszystko w nawiasach.ę ę ą
puj powszechnie w genomach bakteryjnych, szczególnie cz sto b d c wintegrowanymi
Ka&da cytacja musi mie! ł ż
w inne MGE: na przykad plazmid pWR501 niesie a 153 sekwencje insercyjne, które
odzwierciedlenie w ą ł
stanowi 53% jego genomu (W odarczyk & Rudzicz, 2005).
bibliografii. Ka&dy element

z bibliografii musi
by!)cytowany1.2. Sekwencje insercyjne

Najmniejsze elementy transpozycyjne to sekwencje insercyjne, które kodują wyłącz-nie informację genetyczną niezbędną do transpozycji. Długość IS zawiera się zwykle w zakresie 0,8-3 kbp. Elementy te zakończone są zwykle po obu stronach odwróconymi sekwencjami powtórzonymi (IR; ang. inverted repeats) i zazwyczaj kodują jedno białko – transpozazę, przeprowadzającą reakcję transpozycji.

5

Sekwencje insercyjne mogą ulegać transpozycji konserwatywnej – gdy transpozaza katalizuje wycięcie elementu i przeniesienie jej w inne miejsce w genomie, bądź transpozycjireplikacyjnej, wktórejdochodzi do powielenia IS. W obu przypadkach transpozaza rozpoznaje sekwencje IR i dokonuje przecięcia obu (w przypadku transpozycji konserwatywnej) lub jednej (w przypadku transpozycji replikacyjnej) nici DNA. W związku z niesymetrycznym nacinaniem DNA akceptorowego podczas wstawiania IS, zwykle następuje powielenie krótkiej sekwencji DNA (DR, ang. Direct Repeats) po obu stronach wstawionego elementu.

Nukleolityczne właściwości transpozazy związane są często z występowaniem w niej motywu DDE, czyli trzech kwaśnych aminokwasów: asparaginianu (D), asparaginianu

(D) oraz glutaminianu (E). Każdy z tych aminokwasów znajduje się w innej domenie (nazwanych odpowiednio N2, N3 oraz C1). W natywnej trzeciorzędowej strukturze transpozazy aminokwasy DDE znajdują się blisko siebie tworząc centrum katalityczne.

Większość IS ulega insercji w przypadkowe miejsca w genomie, prowadząc często do inaktywacji pewnych genów przez rozerwanie ciągłości ich struktury. Zjawisko to mogłoby się okazać letalne, dlatego proces transpozycji utrzymywany jest na niskim poziomie i podlega ścisłej negatywnej regulacji. Częstość transpozycji może być ograniczona poprzez:

- ograniczenie wpływu endogennego promotora: obecny w sekwencji IS promotor transpozazy jest słaby, często zlokalizowanego w obrębie sekwencji IR, gdzie dodatkowo przyłączająca się transpozaza uniemożliwia przyłączenie polimerazy RNA,

- ograniczenie wpływu egzogennego promotora: gdy IS zostanie wstawiony pod

ę Je'li toż wskazane, ćnie ą ę ą kontrol silnego promotora mo e to owocowa bardzo wysok cz sto ci transpo-

bój si#)używa! ę ą
zycji (wzrasta ekspresja genu transpozazy); w niektórych IS występują sekwencje
wyliczeń%, 1 palindromowe, które umożliwiają powstanie struktury szpilki do w osów, utrudnia-
ją ą wypunktowa% itp. 1

jeśli wiązanie rybosomu – ma to miejsce tylko w wypadku powstawania długich transkryptów z egzogenego promotora,

- ograniczenie ilości powstającej funkcjonalnej transpozazy na drodze mechanizmu opartego na programowanej zmianie ramki odczytu (ang. frame shift): w sekwencji kodowanej dwiema ramkami odczytu (ORF; ang. Open Reading Frame); z niską częstotliwością w czasie translacji dochodzi do przeskoku rybosomu na mRNA, co wywołuje zmianę ramki odczytu i prowadzi do powstania funkcjonalnego białka, będącego funkcjonalną transpozazą elementu.

1.2.1. Klasyfikacja sekwencji insercyjnych

Budowa IS jest prosta: w segmencie genetycznym zawierającym sekwencję insercyjną można wyróżnić fragmenty IR oraz otwarte ramki odczytu dla transpozazy (zwykle jedną). Nieskomplikowany schemat budowy nie ogranicza jednak różnorodności sekwencji insercyjnych, których poznano już blisko 3000 (w bazie ISfinder znajduje się aktualnie 2908 zdeponowanych sekwencji insercyjnych, stan na 12.06.2009). Elementy te pogrupowano na podstawie takich cech, jak: (i) struktura genetyczna IS, (ii) podobieństwo sekwencji aminokwasowej transpozaz, (iii) liczba kodowanych ramek odczytu,

(iv) wielkość, (v) podobieństwo sekwencji IR oraz (vi) długość generowanych sekwencji DR. Opierając się na wymienionych powyżej własnościach IS wyróżniono 25 rodzin sekwencji insercyjnych. Niektóre z wyróżnionych rodzin są endemiczne i bardzo jednolite,

6

inne z kolei są na tyle heterogenne, że konieczny był ich podział na bardziej homogenne grupy. Aktualnie stosowana klasyfikacja sekwencji insercyjnych, wraz z wyszczególnieniem głównych cech poszczególnych rodzin i grup, została zaprezentowana w tabeli 1.1.

Tabela 1.1: Główne cechy rodzin prokariotycznych sekwencji insercyjnych (Siguier et al., 2006)

Rodzina
Grupa
Rozmiar1
DR2
Końce3

IR4
ORF5
Frameshift6
Centrum7

IS1

-

740-1180

8-9

GGnnnTG

T

2

T

DDE

Tytu\$ tabeli jest NAD

1 ORF

800-1200

0-9

GGnnnTG

1

DDE

tabel". Tytu\$ rysunku

ISMhu11

900-4600

0-10

GGnnnTG

T

2

T

DDE

IS1595

ISPna2
1000-1150
8
GGCnnTG

T
1

DDNK

jest POD rysunkiem
ISH4
1000
8
CGCTCTT

1

DDNK

IS1016
700-745
7-9
GGGgctg

1

DDEK

IS1595
900-1100
8
CcTGATT

1

DDNK + ER4R7

ISSod11
1000-1100
8
nnnGcnTATC

1

DDHK + ER4R7

ISNwi1
1080-1200
8
ggnnatTAT

1

DDEK + ER4

ISNha5
3450-7900
8
CGGnnTT

1

DDER/K

IS3

IS150

1200-1600

3-4

TG

T

2

T

DDE

Tabele i rysunki: ka&dy musi by! numerowany i musi mie!

DDE

IS407

1100-1400

4

TG

2

T

odno'ISnik51 z tekstu1000-1400.Tabela/rysunek3-4TG
nie mo&e 2wyst"pi!T przedDDEswoim

pierwszym odno'nikiem. Je'li element nie mie'ci si# na stronie na

IS3

1150-1750

3-4
TGa/g

2
T
DDE

której chcieliby'my go umie'ci!: mo&emy umie'ci! go na kolejnej

IS2
1300-1400
5
TG

2
T
DDE

IS481

-
950-1300
4-15
TGT

T
1

DDE

stronie na górze lub na dodatkowej stronie samego. Tabele i

IS4

IS10
1200-1350
9
CT

T
1

DDE

rysunki numeruje si#)osobno, w tej pracy stosuj" c styl: numer

IS50
1350-1550
8-9
C

1

DDE

rozdzia\$u.numer elementu. Naturalnie oddzielenie tutaj „tabeli" od

ISPepr1
1500-1600
7-8
-T-AA

1

DDE

1.1 jest b\$#dem.
10-13
-AAT

1

DDE

IS4
1400-1600

IS4Sa
1150-1750
8-10
CA

1

DDE

ISH8
1400-1800
10
CAT

1

DDE

IS231
1450-5400
10-12
CAT

1

DDE

IS701

-
1400-1550
4
-

T
1

DDE

ISH3

-
1225-1500
4-5
C-GT

T
1

DDE

IS1634

-
1500-2000
5-6
C

T
1

DDE

IS5

IS903
950-1150
9
GG

T
1

DDE

ISL2
850-1200
2-3
-

1

DDE

ISH1
900-1150
8
-GC

1

DDE

IS5
1000-1500

4
Ga/g

1

DDE

IS1031
850-1050
3
GAa/g

1

DDE

IS427
800-1000
2-4
Ga/g

2
T
DDE

IS11828

IS6

-
700-900
8
GG

T
1

DDE

IS21

-
1750-2600
4-8
TG

T
2

DDE

IS30

-
1000-1700
2-3
-

T
1

DDE

IS66

-
2000-3000
8-9
GTAA

T
3

DDE

ISBst12
1350-1900
8-9
GTAA

T
1

DDE

Kontynuacja na kolejnej stronie

1Wielkość sekwencji wyrażona w liczbie par zasad

2Długość generowanych sekwencji DR

3Konsensus terminalnych fragmętów IS

4Obecność sekwencji IR; T – obecny

5Liczba kodowanych ramek odczytu

6Obecność zjawiska programowanej zmiany ramki odczytu; T – obecna

7Typ centrum katalitycznego

8Rodzina wyróżniona, jeszcze nie opisana

Podpisy - czasem s" bardzo wygodne

7

Tabela 1.1 (cd): Kontynuacja z poprzedniej strony. Główne cechy rodzin prokariotycznych sekwencji insercyjnych

Rodzina
Grupa
Rozmiar
DR
Końce
IRs
ORF
Frameshift
Centrum

IS91

-

1500-2000

0

-

N

1

Y2

IS110

-

1200-1550

0

-
N
1

DDE

IS1111
1200-1550
0

-
Y
1

DDE

IS200/IS605 IS200
600-750
0

-
N
1

Y1

IS608
1300-2000
0

-
N
2

Y1

IS
1200-1500
0

-
N
1

IS607
-
1700-2500
0

-
N
2

Seryna

IS256
-
1200-1500
8-9
Ga/g
T
1

DDE

IS630
-
1000-1400
2
-
T
1 lub 2
T
DDE

IS982
-
1000
3-9
AC
T
1

DDE

IS1380
-
1550-2000
4-5
CC

Ta tabela byśa tak dśuga, &e nie mogśa

T
1

ISAs1

-

1200-1500

8-10

CAGGG

zmieT'ci!1 si# na jednej stronie. Zobacz jak

ISL3

-

1300-2300

8

GG

tenT problem1

zosta\$ rozwi"zany w tej pracy

Tn3

-

>3000

0

GGGG

T

>1

DDE

Przykładem jednej z najbardziej heterogennych rodzin IS jest IS5. Cechami wspól-nymi sekwencji tej rodziny jest duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej transpo-zazy i jej charakterystyczna budowa. W ich strukturze genetycznej można wyróżnić konserwowane domeny N2, N3 oraz C1, charakterystyczne również dla rodziny IS4. Cechą różnicującą jest występująca w rodzinie IS5 krótsza, długości 40 aminokwasów przerwa między domeną N3 a C1. W skład każdej z domen wchodzi jeden aminokwas z motywu DDE.

Napodstawie analiz podobieństwa aminokwasowej transpozakodowanych przez se-

kwencje insercyjne w rodzinie IS5 wyróżniono sześć grup: (i) IS5, (ii) IS427, (iii) IS903, Uwa&aj, &eby na ko%cu linii nie

(iv)IS1031, (v) ISH1 oraz (vi) ISL2, których przedstawiciele zidentyfikowano zarówno zostawi! pojedynczego znaku

w genomach bakterii, (samotnego jak i archeonów a, i, z, Poszczególne itp.), &eby grupy różnią się długością gene-rowanych sekwencji powtórnie rozdzielonych. ! Wparyśódliczba grup wyróżnia się IS427, która koduje dwie ramki odczytu, a sekwencja jednostki kacy nukleotydowa (np. 5cm) elementów tej rodziny sugeruje możliwość zajścia programowanej zmiany ramki odczytu, co w konsekwencji może prowadzić do powstania jednego fuzyjnego białka transpozazy.

Sekwencje insercyjne rodziny IS5 zwykle ulegają insercji w przypadkowych miejscach genomu. Jednak w przypadku grup IS5, IS427 oraz nielicznych członków grupy ISL2 obserwuje się preferencyjne wstawianie w sekwencję 5'-YTAR-3' (zwykle 5'-CTAG-3'). Pewien stopień specyficzności co do miejsca integracji wykazuje również

IS903 i jej homologi (Hu et al., 2001).

Piszemy „co” a nie

”co”

1.3. Identyfikacja elementów transpozycyjnych

Istnieją dwie podstawowe metody identyfikacji IS: metoda *in silico*, polegająca na informatycznej analizie sekwencjonowanych genomów bakterii oraz metoda *in vivo*, polegająca na „złapaniu” elementu transpozycyjnego w trakcie jego transpozycji. Zaletą pierwszej z metod jest uzyskiwanie informacji o budowie nukleotydowej IS, położeniu w genomie i liczbie kopii. Niestety, jest to metoda kosztowna oraz nie daje pewności, że zidentyfikowane elementy są istotnie funkcjonalne. Ponadto metoda ta pozwala na identyfikację jedynie wyraźnie zdefiniowanych grup transpozozonów – o znanych sekwencjach transpozaz, wyraźnych IR i długich DR. Zidentyfikowanie elementów nie spełniających tych warunków może zakończyć się niepowodzeniem. Szczególnie trudne jest wyróżnienie w sekwencji nowych typów TE, bądź elementów o bardziej złożonej

8

strukturze genetycznej. Elementy takie można jednak zidentyfikować wykazując ich aktywność transpozycyjną *in vivo* - nie uzyskujemy jednak w ten sposób informacji o sekwencji nukleotydowej TE, ani o jego dystrybucji w genomie. Powszechnie stosowana metoda zakłada wykorzystanie wektorów pułapkowych umożliwiając selekcję klo-

KA*DA informacja, z wyjątkiem 'ci oraz

nów bakterii, w których zaszły spontanicznie zdarzenia transpozycyjne. Przykładami wśasných pomysłów, musi być! związana z

takich wektorów pułapkowych cytacji mogą być wykorzystane w tej pracy, plazmidy pMEC1 oraz pMAT1. Plazmidy te umożliwiają identyfikację wszystkich, nawet kryptycznych TE. Istnieją również inne typy wektorów pułapkowych, które służą do wybiórczej identyfikacji jedynie elementów charakteryzujących się określoną cechą. Przykładem jest wektor pCM132TC, który umożliwia „wychwycenie” jedynie takich TE, których obecność umożliwia transkrypcję genów położonych poniżej miejsca docelowej transpozycji (Bartosik et al., 2008).

Rozdział 2

Cel pracy

Celem pracy jest identyfikacja i charakterystyka funkcjonalnych elementów transpozy-Cel pracy. Piszemy

cyjnych w szczepach *Paracoccus sulfuroxidans* oraz *P. zeaxanthinifaciens* z wykorzy-krótco co jest celem
staniem plazmidów pułapkowych pMAT1 oraz pMEC1.

pracy, nie piszemy nic

o wynikach!

10

Rif^R; pochodna dzikiego szczepu JCM 7686

Rif^R; pochodna dzikiego szczepu JCM 7685

Rif^R; pochodna dzikiego szczepu DSM 11593

Rozdział 3

Materiały

Odwołanie do tabel

3.1. Szczepy i plazmidy bakteryjne

Szczepy i plazmidy bakteryjne wykorzystane w pracy zostały przedstawione w tabelach odpowiednio 3.1 i 3.2.

Tabela 3.1: Szczepy bakteryjne wykorzystane w pracy; ZGB – Zakład Genetyki Bakterii Uniwersytetu Warszawskiego

Szczep
Charakterystyka
Pochodzenie

E. coli DH5 α
F⁻; Φ 80d LACZ M15 (lacZY
Sambrook & Russell, 2001

A-orgF) U169 deoR recA1 endA1

hsdR17 phoA supE44 λ - thi1

gyrA96 relA1

E. coli TG1
F'; [traD36 proAB+ lacIQ

lacZ M15] supE44 hsd 5 (lac-
Tabele w tej pracy zrobione s" zgodnie z

proAB)

obecn" mod": wg niej nale&y unikaR!

P. aestuarii PAT1

Rif ; pochodna dzikiego szczepu

wszelkich kresek, szczególnie

DSM 19484

pionowych. Spójrz: brak kresek

R

P. alcaliphilus JCM 7364R

Rif ; pochodna dzikiego szczepu

dzia\$owych wcale nie obni&a czytelno'ci JCM 7364

tej tabeli

P. alkenifer DSM 11593R

P. aminophilus JCM 7686R

P. aminovorans JCM 7685R

P. denitrificans DSM 413RJe'li para: RifAutor,R;pochodnaRok niedzikiego szczepu
wyznacza DSMjednoznacznie413 pozycji

P. haeundaensis PHA1 w bibliografiiRifR; dodajemy pchodnadzikolejneiego szczepu litery alfabetuLMG P-
21903

P. halophilus PHL1 RifR; pochodna dzikiego szczepu

JCM 14014

P. homiensis DSM 17862R RifR; pochodna dzikiego szczepu

DSM 17862

Sambrook & Russell, 2001

Kolekcja ZGB

Bartosik et al., 2002a

Bartosik et al., 2001

Bartosik et al., 2002a

Bartosik et al., 2002a

Kolekcja ZGB

Kolekcja ZGB

Kolekcja ZGB

Kolekcja ZGB

P. kamogawensis PKW1
RifR; pochodna dzikiego szczepu
Kolekcja ZGB

YSFL3

...
Kontynuacja na kolejnej stronie

Rozdział 5

Wyniki

5.1. Wstępna charakterystyka szczepów *P. SULFU-*

ROXIDANS JCM 14013 i *P. ZEAXANTHINIFACIENS*

ATCC 21588

Analizowane w pracy szczepy to bakterie z rodzaju *Paracoccus*, należące do klasy Alphaproteobacteria. Nazwa *Paracoccus* (łac. para – prawie, coccus – kula) związana jest z kształtem komórek tych bakterii: są to gramujemne pałeczki do 2 μm długości. *Paracoccus* to bakterie gramujemne o bezwzględnie tlenowym metabolizmie. Potrafią wykorzystywać różne związki organiczne jako źródło węgla. Komórki tych bakterii są pozbawione zdolności do ruchu i nie tworzą form przetrwalnych. Optimum temperatury wzrostu mieści się w granicach 25-37°C (van Spanning et al., 2005).

Paracoccus sulfuroxidans JCM 14013 został zakupiony z kolekcji Japan Collection of Microorganisms. Szczep ten został wyizolowany z czynnego osadu bioreaktora oczysz-

czalni ścieków. Nazwa szczepu pochodzi od jego zdolności do utleniania siarki (łac. Tłumaczenia w tek'cie

sulfur – siarka, oxidans – utlenianie) (Liu et al., 2006).

P. zeaxanthinifaciens ATCC 21588 został zakupiony w kolekcji American Type Culture Collection. Został on wyizolowany z wodorostów rosnących u wybrzeży Morza Czerwonego. Nazwa szczepu pochodzi od jego zdolności do produkcji karotenoidu zeaksantyny (łac. zeaxanthinum – zeaksantyna, faciens – robić, wykonywać). Szczep ten wyizolowano w latach 60, wraz z dużą grupą innych bakterii, zdolnych do produkcji zeaksantyny. Został on początkowo przypisany do rodzaju *Flavobacterium*. Późniejsza analiza sekwencji 16S rDNA szczepu spowodowała zakwalifikowanie go do rodzaju *Paracoccus* (Berry et al., 2003).

Rycina 5.1a przedstawia morfologię kolonii *P. sulfuroxidans JCM 14013* wyrosłych na podłożu LA. Mają one jednorodny rozmiar, okrągły kształt, są beżowe, błyszczące, o gładkiej strukturze. Morfologię kolonii *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 na zestalo-

nym podłożu F zaprezentowano na rycinie 5.1b. W tym przypadku kolonie są również jednorodne, błyszczOdwoące, wypukłSaniełe, mają okrągły kształt oraz gładką strukturę. Charak-

ą ę do „podobrazka"żłą ą ą ą

teryzuj si one intensywnie ó t barw , co jest zwi zane z akumulacj w komórce zeaksantyny.

23

Wstawiaj do pracy

obrazy mo&liwie

dobrej jako'ci.

Najlepiej pliki o

rozszerzeniach png a

nie jpg

(a) *P. sulfuroxidans* JCM 14013, podłoże LA (b) *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588, pod-łoże F

Rycina 5.1: Morfologia kolonii badanych szczepów na odpowiednich podłożach

5.1.1. Ustalenie optymalnych warunków wzrostu badanych szcze-pów bakterii

WRycinapoczątkowymz\$&onaeta piez badań ustalono optymalne warunki wzrostu *P. zeaxanthinifa-*ciensdwóchATCCobrazków21588oraz *P. sulfuroxidans* JCM 14013 w warunkach laboratoryjnych. Według danych literaturowych *P. zeaxanthinifaciens* jest zdolny do wzrostu na pod-łożach: TSB, MB (Berry et al., 2003) oraz F (H"umbelin et al., 2002) w temperaturze 28°C, natomiast *P. sulfuroxidans* na podłożu LA w temperaturze 30°C (Liu et al.,

2006). Aby to zweryfikować nocne hodowle *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 oraz W pracy zdecydowano si# na

P. sulfuroxidans JCM 14013 rozcieńczono 10nazywanie–6wysiano na następujące podłoża: LA, obrazków

Rycinami.

TSA, MA oraz F (podłoża zestawiono agarem) Jest. Szalkito bardziej inkubowanouniwersalnetemperaturze, ni& od-powiednio, 25°C oraz 30°C w czasie 48 godzin Rysunek. Zaobserwowano lub Zdjęcie wzrost cieczy P. Obraz sulfuroxidans na podłożach LA oraz TSA, natomiast P. zeaxanthinifaciens jedynie na podłożu F.

Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano, że dalsze analizy prowadzone będą z wykorzystaniem podłoży: F dla P. zeaxanthinifaciens oraz LA dla P. sulfu-roxidans. Hodowle płynne prowadzono na odpowiednich podłożach (LB lub F) z intensywnym wytrząsaniem w temperaturze, odpowiednio, 25°C lub 30°C.

5.1.2. Identyfikacja plazmidów

W kolejnym etapie badań określono liczbę i wielkość plazmidów występujących w P. ze-axanthinifaciens ATCC 21588 oraz P. sulfuroxidans JCM 14013 Identyfikację natural-nych plazmidów w badanych szczepach przeprowadzono stosując metodę ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu z bromkiem etydy. Uzyskany preparat DNA rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym, co przedstawia rycina 5.2a1.

Na podstawie przeprowadzonej analizy 4,5 stwierdzono obecność czterech plazmidów w P. sulfuroxidans JCM 14013 i brak replikonów tego typu w P. zeaxanthinifaciens ATCC 21588. Wykorzystując replikony o zdefiniowanej wielkości ustalono wielkość naturalnych plazmidów szczepu P. sulfuroxidans JCM 14013. Plazmidy nazwano odpowiednio: pSUL1 (ok. 4,5 kbp), pSUL2 (ok. 10 kbp), pSUL3 (ok. 75 kbp) oraz pSUL4 (ok. 80 kbp).

Ze względu na lepszą czytelność zostały zamieszczone negatywy zdjęć żeli agarozowych. Uwaga ta stosuje się do wszystkich zdjęć zamieszczonych w pracy

24

Odwołanie do innego fragmentu

pracy

Zastosowana wyżej metoda izolacji DNA umożliwia jedynie identyfikację plazmidów o wielkości mniejszej niż ok. 150 kbp. W celu identyfikacji megaplazmidów dokonano lizy komórek w żelu i jednoczesnego rozdziału elektroforetycznego wysokocząsteczkowego DNA wg zmodyfikowanej metody Eckhardta (patrz sekcja 4.3.3). Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 5.2b.

(a) (b)

Takie podpisy do

Rycina 5.2: Identyfikacja plazmidów *P. sulfuroxidans* JCM 14013 oraz *P. zeaxanthinifaciens* obrazków dobrze robi! w

ATCC 21588; wyniki uzyskane (a) metodą ultrawierowania DNA w gradiencie chlorku cezu CorelDraw albo Inkscape,

z bromkiem etyldyny; w celu określenia wielkości zidentyfikowanych replikonów jako wzorców nie używaj do tego Painta

użyto wymienionych na rycinie plazmidów, wielkości podano w kpz; ramką zaznaczono ani Photoshopa

pasmo chromosomowego DNA; (b) z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Eckhardta; megaplazmidy R. etli CE3 wykorzystano jako wzorzec wielkości DNA

W szczepie *P. zeaxanthinifaciens* zidentyfikowano jeden megaplazmid, który nazwano pZEA1. Jego wielkość, na podstawie porównania z megaplazmidami R. etli CE3, oszacowano na około 300 kpz. W przypadku *P. sulfuroxidans* stwierdzono brak replikonów o wielkości powyżej 150 kpz.

5.1.3. Badanie wrażliwości szczepów na wybrane antybiotyki

Do identyfikacji elementów transpozycyjnych wykorzystuje się plazmidy pułapkowe, które zazwyczaj wprowadza się do bakterii drogą koniugacji. W tym celu konieczne jest zastosowanie szczepu biorcy charakteryzującego się cechą umożliwiającą jego selekcję, na przykład opornego na określony antybiotyk. Ustalenie dawek selekcyjnych odpowiednich antybiotyków dla analizowanych szczepów jest więc konieczne dla powodzenia zaplanowanych doświadczeń.

Otrzymanie klonów opornych na ryfampicynę

W celu uzyskania klonów opornych na ryfampicynę, które zostaną wykorzystane w roli biorców w procesie koniugacji, zagęszczone nocne hodowle szczepów *P. sulfuroxidans* JCM 14013 oraz *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 wysiano na zestalone podłoże, odpowiednio LA lub F, uzupełnione ryfampicyną w stężeniu 50 µg/ml. Bakterie inkubowano 48 godzin. Na tak przygotowanym podłożu nastąpił wzrost jedynie mutantów

...

Tabela 5.1: Badanie oporności na tetracyklinę szczepów *P. sulfuroxidans* PSF1 oraz *P. sulfuroxidans* PSF1 z wprowadzonym wektorem pMEC1 ; podane wartości określają liczbę kolonii (cfu/ml) uzyskanych na odpowiednim podłożu

Stężenia tetracykliny ($\mu\text{g/ml}$)

LA*

LA + Km†

Badany szczep

5

10

20

P. sulfuroxidans PSF1

∞ ‡

$5,1 \times 10^3$

–§

2×10^9

–

P. sulfuroxidans (pMEC1)

$3,1 \times 10^9$

$4,2 \times 10^8$

–

3×10^9

$3,8 \times 10^9$

* podłoże LA bez antybiotyku;

† podłoże LA z kanamycyną w stężeniu $50 \mu\text{g/ml}$;

‡ wzrost w postaci murawy;

§ brak wzrostu
Przykład tabeli z

wyjaśnieniami użytymi

Wyniki dotyczące wzrostu *P. zeaxanthinifaciens* PZX1 na podłożach zawierających tetracyklinę w wybranych stężeniach zostały zamieszczone w tabeli 5.2. Na ich podstawie ustalono dawkę selekcyjną tetracykliny na 3 µg/ml.

Tabela 5.2: Badanie oporności na tetracyklinę szczepów *P. zeaxanthinifaciens* PZX1 oraz *P. zeaxanthinifaciens* PZX1 niosącego pMEC1 ; podane wartości określają liczbę kolonii (cfu/ml) uzyskanych na odpowiednim podłożu; stężenia tetracykliny wyrażone w µg/ml

Stężenia tetracykliny

F*

F + Km†

Badany szczep

1

2

3

5

10

P. zeaxanthinifaciens PZX1

4 x 10²

–§

–

–

—
1,6 x 10⁷
—

P. zeaxanthinifaciens (pMEC1)

∞‡

∞ ∞ ∞ ∞ 1,2 x 10⁷

1,1 x 10⁷

* podłoże F bez antybiotyku;

† podłoże F z kanamycyną w stężeniu 50 µg/ml;

‡ wzrost w postaci murawy; § brak wzrostu

...

Rycina 6.1: ISPze1 (wyróżniona ramką) na drzewie filogenetycznym typu bootstrap. Zamieszczono sekwencje insercyjne zidentyfikowane w Zakładzie Genetyki Bakterii Uniwersytetu Warszawskiego. Dla każdej z rodzin IS przyporządkowany został inny kolor. Symbol gwiazdy umieszczono przy sekwencjach grupujących się w gałęzi zakwalifikowanej do innej grupy lub rodziny

Je'li wstawiasz taki schemat NIE

WSTAWIAJ GO JAKO JPG. Pliki jpg są kompresowane, co jest stratnie, pojawi się dodatkowa rozdzielczość pikseli, z bliska po oby dokończenie rozpoczętego do wiadczenia z zastosowaniem plazmidu pMAT1 dla wydrukowaniu litery b#d" niekwestionuje. Łącznie P. zeaxanthinifaciens. Uzyskane wyniki uzupełnią naszą wiedzę na temat elementów transpozycyjnych w tym szczepie i by może przybliżyć nam do wyjaśnienia wektorowej (pdf, eps, svg) albo (i to niezwykle wysokiej czułości obserwacji P. zeaxanthinifaciens wprze-

pewnie lepsze dla wi#kszo'ci osób)ł z
prowadzonym do wiadczeniu. Wskazana by aby równie kontynuacja prac ze szczepem kompresowane
bezstratnie: np. png

P. sulfuroxidans. Ponieważ proces poszukiwania elementów transpozycyjnych w tym szczepie z
wykorzystaniem pMAT1 nie przyniósł oczekiwanego rezultatu konieczne jest przeprowadzenie analogicznego
doświadczenia, do zaprezentowanego w niniejszej pracy,
zwykorzystaniemwektorapułapkowego dysponującego inną kasetą selekcyjną, naprzy-kład zaproponowanego
w pracy pMEC1.

46

Bibliografia. Na ko%cu pracy. Ka&da z pozycji

cytowanych w pracy jest tu umieszczona. Nie

ma tu &adnej pozycji, która nie by\$oaby

cytowana w pracy. Sposobów sk\$adu

Bibliografia bibliografii jest bardzo wiele. Co istotne: je'li na który' si# zdecydujesz musisz by!

konsekwentny. Je'li praca jest pisana po

polsku: równie& bibliografia powinna by!)po

polsku (dotyczy to skrótów typu: „str.”

Bartosik, D., Baj, J., Bartosik, A. A. & Włodarczyk, M. 2002a. Characterization albo „red.”). Inaczej buduje si#
wpis

of the replicator region of megaplasmid pTAV3 of *Paracoccus versutus* and search bibliograficzny dla
czasopisma, inaczej dla

for plasmid-encoded traits. *Microbiology* 148:871–881.

ksi"zki, inaczej dla pracy dyplomowej,

inaczej dla programu komputerowego...

Bartosik, D., Baj, J., Sochacka, M., Piechucka, E. & Włodarczyk, M. 2002b. Obejrzyj jak to jest zrobione w tej
pracy. I

Molecular characterization of functional modules of plasmid pWKS1 of *Paracoccus pami#taj*: je'li bibliografia

zaczyna by!

pantotrophus DSM 11072. *Microbiology* 148:2847–2856.

dłuzsza od całej reszty pracy to co' jest nie tak.

Bartosik, D., Białkowska, A., Baj, J. & Włodarczyk, M. 1997. Construction of mobilizable cloning vectors derived from pBGS18 and their application for analysis of replicator region of a pTAV202 mini-derivative of *Paracoccus versutus* pTAV1 plasmid. *Acta Microbiol Pol* 46:387–392.

Bartosik, D., Putyrski, M., Dziewit, L., Malewska, E., Szymanik, M., Ja-giello, E., Lukasik, J. & Baj, J. 2008. Transposable modules generated by a single copy of insertion sequence ISPme1 and their influence on structure and evolution of natural plasmids of *Paracoccus methylutens* DM12. *J Bacteriol* 190:3306–3313.

Bartosik, D., Sochacka, M. & Baj, J. 2003a. Identification and characterization of transposable elements of *Paracoccus pantotrophus*. *J Bacteriol* 185:3753–3763.

Bartosik, D., Szymanik, M. & Baj, J. 2003b. Identification and distribution of insertion sequences of *Paracoccus solventivorans*. *Appl Environ Microbiol* 69:7002–7008.

Bartosik, D., Szymanik, M. & Wysocka, E. 2001. Identification of the partitioning site within the repABC-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1. *J Bacteriol* 183:6234–6243.

Beitz, E. 2000. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* 16:135–139.

Berry, A., Janssens, D., Humbelin, M., Jore, J. P. M., Hoste, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Bretzel, W., Mayer, A. F., Lopez-Ulibarri, R., Shan-mugam, B., Swings, J. & Pasamontes, L. 2003. *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:231–238.

Birnboim, H. C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523.

Chandler, M. & Mahillon, J. 2002. Insertion sequences revisited. Gellert M., Lambowitz A.M. W C. N.L., R. Craigie, G. M. & L. A.M. (red.), *Mobile DNA II*, str. 305–366. American Society for Microbiology Press Washington (DC).

47

Chen, W. P. & Kuo, T. T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21:2260.

Daneshvar, M. I., Hollis, D. G., Weyant, R. S., Steigerwalt, A. G., Whitney, A. M., Douglas, M. P., Macgregor, J. P., Jordan, J. G., Mayer, L. W., Rassouli, S. M., Barchet, W., Munro, C., Shuttleworth, L. & Bernard, K. 2003. *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. *J Clin Microbiol* 41:1289–1294.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584–588.

- Gamas, P., Chandler, M. G., Prentki, P. & Galas, D. J. 1987. Escherichia coli integration host factor binds specifically to the ends of the insertion sequence IS1 and to its major insertion hot-spot in pBR322. *J Mol Biol* 195:261–272.
- Gerdes, K., Larsen, J. E. & Molin, S. 1985. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol* 161:292–298.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704.
- Harker, M., Hirschberg, J. & Oren, A. 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *Int J Syst Bacteriol* 2:543–548.
- Hu, W. Y., Thompson, W., Lawrence, C. E. & Derbyshire, K. M. 2001. Anatomy of a preferred target site for the bacterial insertion sequence IS903. *J Mol Biol* 306:403–416.
- Humbelin, M., Thomas, A., Lin, J., Li, J., Jore, J. & Berry, A. 2002. Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. *Gene* 297:129–139.
- Hynes, M. F. & McGregor, N. F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* 4:567–574.
- Kushner, S. R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. W. H. W. Boyer & S. Micosia (red.), *Genetic Engineering*, str. 17–23. Elsevier-North Holland Biomedical Press.
- Lam, S. T., Lam, B. S. & Strobel, G. 1985. A vehicle for the introduction of transposons into plant-associated pseudomonads. *Plasmid* 13:200–204.
- Lassmann, T. & Sonnhammer, E. L. L. 2006. Kalign, Kalignvu and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 34:W596–9.
- Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, T.-J., Lee, W. J. & Kim, Y. T. 2004. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1699–1702.
- Liu, X.-Y., Wang, B.-J., Jiang, C.-Y. & Liu, S.-J. 2006. *Paracoccus sulfuroxidans* sp. nov., a sulfur oxidizer from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2693–2695.

Liu, Z.-P., Wang, B.-J., Liu, X.-Y., Dai, X., Liu, Y.-H. & Liu, S.-J. 2008. *Paracoccus halophilus* sp. nov., isolated from marine sediment of the South China Sea, China, and emended description of genus *Paracoccus* Davis 1969. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:257–261.

Madden, T. L., Tatusov, R. L. & Zhang, J. 1996. Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol*

266:131–141.

Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R. B., Roepstorff, P. & Gerdes, K. 2003. Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell* 12:1477–1487.

Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290.

Pukall, R., Laroche, M., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Stac-kebrandt, E. & Ulber, R. 2003. *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., an L-serine-dehydratase-producing coccus isolated from the marine bryozoan *Bugula plumosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:443–447.

R Development Core Team 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16:276–277.

Roh, S. W., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Kim, K.-H., Kim, M.-S., Shin, K.-S., Yoon, J.-H., Oh, H.-M. & Bae, J.-W. 2009. *Paracoccus aestuarii* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:790–794.

Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3.

wyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. & Chandler, M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34:D32–6.

Szuplewska, M. & Bartosik, D. 2009. Identification of a mosaic transposable element of *Paracoccus marcusii* composed of insertion sequence ISPmar4 (ISAs1 family) and an IS1247a-driven transposable module (TMO). *FEMS Microbiol Lett* 292:216–221.

Tsubokura, A., Yoneda, H. & Mizuta, H. 1999. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1:277–282.

van Spanning, R. J. M., Stouthamer, A. H., Baker, S. C. & van Verseveld, H. W. 2005. Genus XII. *Paracoccus*. W D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley

&G. M. Garrity (red.), *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, C, 2. wyd., str. 197–204. Springer-Verlag, N. Y.

Włodarczyk, M. & Rudzicz, G. 2005. Megaplazmidy - próba definicji, rozpowszechnienie i różnorodność kodowanych fenotypów. *Post Mikrobiol* 44:3–16.