



EduAkademia.pl

prace naukowe na zlecenie

Przykładowa-praca-licencjacka-154

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii

Pierwsza strona pracy musi

być zgodna z

rozporządzeniem rektora i

wyglądać mniej więcej tak.

Nie wstawia się orszków,

znaczków, poziomych linii i

innych upiększeń

Poszukiwanie funkcjonalnych elementów

transpozycyjnych

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

Praca licencjacka

na kierunku BIOLOGIA

Tutaj jest drobne odstępstwo 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 APD. 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.L0M?;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

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 końcu

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

Pracę piszemy czcionką "szeryfową" (np. Times New Roman) wielkości 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.

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 integronów 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- zosta-
przy-
wyszechnie styl zarówno w genomach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Charaktery-

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

*je-
li 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, si-
ę Rok; se-
wencje-
li insercyjne (IS, ang. Insertion Sequence) oraz transpozony (Tn), wśród
trzech: Au-
tor-
których wy-
ró-
ta-
l., Rok, -
znia-
się transpozony -
łożone-
nie-
łożone. Elementy transpozycyjne wystę-

wszystko w nawiasach.ę ę ą
pój 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 transpo-
zycjireplikacyjnej, wktóre dochodzi do powielenia IS. Wobu przypadkach transpozaza rozpoznaje sekwencje IR i
dokonuje przecięcia obu (w przypadku transpozycji konser-watywnej) 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 trzyczłonowej 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 ogra-niczona 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 wyliczące, palindromowe, które umożliwiają powstanie struktury szpilki do wiązania, utrudniają wiązanie z rybosomem itp.

Jeżeli wiązanie z rybosomem – 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 fuzyjnego 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: każdy musi być numerowany i musi mieć!
DDE

IS407
1100-1400
4
TG

2
T

odnośnik 51 z tekstu 1000-1400. Tabela/rysunek 3-4 TG
nie może występować przed DDE swoim

pierwszym odnośnikiem. Jeżeli element nie ma się na stronie na

IS3
1150-1750
3-4
TGa/g

2
T
DDE

której chcielibyśmy go umieścić: możemy umieścić 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

rozdziału 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 framgmentów 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 byÅa tak dÅuga, &e nie mogÅa

T

1

ISAs1

-

1200-1500

8-10

CAGGG

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

ISL3

-

1300-2300

8

GG

tenT problem1
został rozwi"zany w tej pracy
Tn3
-
>3000
0
GGGG
T
>1

DDE

Przykładem jednej z najbardziej heterogennych rodzin IS jest IS5. Cechami wspólnymi sekwencji tej rodziny jest duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej transpozazy 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 transpozazy kodowanych przez se-

kwencje insercyjne w rodzinie IS5 wyróżniono sześć grup: (i) IS5, (ii) IS427, (iii) IS903, Uważając, aby na końcu linii nie

(iv) IS1031, (v) ISH1 oraz (vi) ISL2, których przedstawiciele zidentyfikowano zarówno w pojedynczym znaku

w genomach bakterii, (samotnego jak i archeonów, i, z, Poszczególne itp.), a grupy różnią się długością genetycznych sekwencji powtórnie rozdzielonych. W przypadku grup IS427, która koduje dwie ramki odczytu, a sekwencja 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 spontaniczne zdarzenia transpozycyjne. Przykładami właściwych pomysłów, musi być) związana z

takich wektorów pułapkowych cytacja 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

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!
dzikiego szczepu
P. aestuarii PAT1
Rif ; pochodna

wszelkich kresek, szczególnie
DSM 19484

pionowych. Spójrz: brak kresek
R
dzikiego szczepu
P. alcaliphilus JCM 7364R
Rif ; pochodna

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

tej tabeli
JCM 7364

R
dzikiego szczepu
P. alkenifer DSM 11593R
Rif ; pochodna

DSM 11593

P. aminophilus JCM 7686R
RifR; pochodna
dzikiego szczepu

JCM 7686

Sambrook & Russell, 2001

Kolekcja ZGB

Bartosik et al., 2002a

Bartosik et al., 2001

Bartosik et al., 2002a

P. aminovorans JCM 7685R
Rif^R; pochodna dzikiego szczepu
Bartosik et al., 2002a

JCM 7685

P. denitrificans DSM 413R Je'li para: Rif^{Autor},; pochodna Rok niedzikiego szczepu
Kolekcja ZGB

R

DSM 413

wyznacza jednoznacznie pozycji

P. haeundaensis PHA1 w bibliografii Rif^R; dodajemy pochodna dzikiego szczepu
Kolekcja ZGB

LMG P-21903

litery alfabetu

P. halophilus PHL1
Rif^R; pochodna dzikiego szczepu
Kolekcja ZGB

JCM 14014

P. homiensis DSM 17862R
Rif^R; pochodna dzikiego szczepu
Kolekcja ZGB

DSM 17862

P. kamogawensis PKW1
Rif^R; pochodna dzikiego szczepu

Kolekcja ZGB

YSFL3

...

Kontynuacja na kolejnej stronie

11

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 zestawo-

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

teryzują się one intensywnie różną barwą, co jest związane z akumulacją w komórce zeaksantyny.

23

Wstawiaj do pracy

obrazy możliwie

dobrej jakości.

Najlepiej pliki o

rozszerzeniach png a

nie jpg

(a) *P. sulfuroxidans* JCM 14013, podłoże LA

(b) *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588, podłoże F

Rycina 5.1: Morfologia kolonii badanych szczepów na odpowiednich podłożach

5.1.1. Ustalenie optymalnych warunków wzrostu badanych szczepów bakterii

W Rycinie początkowym z & na etapie badań ustalono optymalne warunki wzrostu *P. zeaxanthinifaciens* dwóch ATCC obrazków 21588 oraz *P. sulfuroxidans* JCM 14013 w warunkach laboratoryjnych. Według danych literaturowych *P. zeaxanthinifaciens* jest zdolny do wzrostu na podłożach: TSB, MB (Berry et al., 2003) oraz F (Humbelin 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 się na

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

TSA, MA oraz F (podłoża zestawiono agarowo) Jest. Szalkito bardziej inkubowanouniwersalnetemperaturze, ni& od-powiednio, 25°C oraz 30°C w czasie 48 godzin Rysunek. Zaobserwowano lub Zdjęcie wzrost cieczy *P. 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. sulfuroxidans*. 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. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 oraz *P. sulfuroxidans* JCM 14013 Identyfikację naturalnych plazmidów w badanych szczepach przeprowadzono stosując metodę ultrawirowania 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).

1 Ze względu na lepszą czytelność zostały zamieszczone negatywy zdjęć żeli agarozowych. Uwaga ta stosuje się do wszystkich zdjęć zamieszczonych w 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 ultrawierwienia DNA w gradiencie chlorku cezu CorelDraw albo Inkscape,

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

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

pasmu 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 kbp. W przypadku *P. sulfuroxidans* stwierdzono brak replikonów o wielkości powyżej 150 kbp.

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

...

25

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 (µg/ml)

LA*

LA + Km†

Badany szczep

5

10

20

P. sulfuroxidans PSF1

∞‡

5,1 x 10³

–§

2 x 10⁹

–

P. sulfuroxidans (pMEC1)

3,1 x 10⁹

4,2 x 10⁸

–

3 x 10⁹

3,8 x 10⁹

* podłoże LA bez antybiotyku;

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

‡ wzrost w postaci murawy;

§ brak wzrostu

Przykład tabeli z

wyjaczeniami u&tych

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. Zamieszczone sekwencje insercyjne zidentyfikowano 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 s" kompresowane s" stratnie, pojawi" si# przynie mo e dopiero wykonanie kolejnych analiz. Przede wszystkim wskazane by- ł dodatkowe piksele, z bliska po oby doko czenie rozpocz tego do wiadczenia z zastosowaniem plazmidu pMAT1 dla wydrukowaniu litery b#d" nieksta\$tnę. ł a ę P. zeaxanthinifaciens . Uzyskane wyniki uzupe ni by nasz wiedz na temat elemen- Najlepiej wstawiaj rysunki w postaci z z ł ś tów transpozycyjnych w tym szczepie i by mo e przybli y by nas do wyja nienia wektorowej (pdf, ę eps, ś svg) albo (i to

niezwykle wysoki jest stopień transpozycji obserwowanej w *P. zeaxanthinifaciens* w porównaniu z innymi szczepami. Wynik ten jest prawdopodobnie lepszy dla większości osób, które prowadzą badania w tym kierunku. Wskazano, aby równie kontynuacja prac ze szczepem kompresowanym 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, z wykorzystaniem wektora pułapkowego dysponującego inną kasetą selekcyjną, na przykład zaproponowanego w pracy pMEC1.

46

Bibliografia. Na końcu pracy. Każda z pozycji cytowanych w pracy jest tu umieszczona. Nie ma tu żadnej pozycji, która nie byłaby cytowana w pracy. Sposobów składu

Bibliografia bibliografii jest bardzo wiele. Co istotne: jeżeli na któryś zdecydujesz musisz być konsekwentny. Jeżeli praca jest pisana po polsku: również bibliografia powinna być po polsku (dotyczy to skrótów typu: „str.”)

Bartosik, D., Baj, J., Bartosik, A. A. & Włodarczyk, M. 2002a. Characterization albo „red.”). Inaczej buduje się 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. książki, 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 pantotrophus*: je'li bibliografia zaczyna by!

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

długość od całości 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.

48

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.
- Siguiet, 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 IS_{Pmar4} (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.

