



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana KRHAČ LEVAČIĆ

**TESTIRANJE PRENOSA TERAPEVTSKEGA  
PLAZMIDA ZA GENSKO ZDRAVLJENJE V  
NARAVNO PRISOTNE BAKTERIJE NA KOŽI PRI  
PSIH Z MASTOCITOMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana KRHAČ LEVAČIĆ

**TESTIRANJE PRENOSA TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA ZA GENSKO  
ZDRAVLJENJE V NARAVNO PRISOTNE BAKTERIJE NA KOŽI PRI PSIH Z  
MASTOCITOMI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**TESTING THE TRANSFER OF THERAPEUTIC PLASMID FOR GENE THERAPY  
IN THE SKIN MICROBIOTA OF DOGS WITH MAST CELL TUMORS**

M.SC. THESIS  
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega progama 2. stopnje – Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta) in Onkološkem inštitutu Ljubljana.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Tanjo Kunej, za somentorico prof. dr. Majo Čemažar in za recenzentko doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Branka JAVORNIK  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica:                         prof. dr. Tanja KUNEJ  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica:                         prof. dr. Maja ČEMAŽAR  
                                       Onkološki inštitut Ljubljana

Članica:                         doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Ana Krhač Levačić

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 575:636.09(043.2)  
KG psi/rak/mastocitomi/genska terapija/IL-12/odpornost proti antibiotikom/verticalni genski prenos  
AV KRHAČ LEVAČIĆ, Ana, dipl. bioteh. (UN)  
SA KUNEJ, Tanja (mentor)/ČEMAŽAR, Maja (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2013  
IN TESTIRANJE PRENOSA TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA ZA GENSKO ZDRAVLJENJE V NARAVNO PRISOTNE BAKTERIJE NA KOŽI PRI PSIH Z MASTOCITOMI  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)  
OP XIV, 77 str., 23 pregл., 16 sl., 3 pril., 102 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Obširnejše znanje o človekovem genomu in tehnološki napredek na področju molekularne biologije omogočata tudi razvoj genske terapije. Z vidika varnosti uporabe genske terapije v klinični praksi je lahko problematična tudi prisotnost genskega zapisa za odpornost proti antibiotikom na vektorjih za vnos terapevtskega gena. Genski zapis bi se potencialno lahko prenesel v bakterije, ki so v bližini aplikacije genske terapije. Trenutno se za elektrogensko terapijo z interlevkinom-12 uporablja komercialno dostopni terapevtski plazmid pORF-hIL-12 z zapisom za humani interlevkin-12. Plazmidni selekcijski označevalec je gen *bla*, z zapisom za odpornost proti ampicilinu. V magistrskem delu smo ugotovljali možnost horizontalnega prenosa gena *bla* in vitro in in vivo v bakterije, ki smo jih izolirali iz površine kože psov pred in po genski terapiji. Z reakcijo PCR smo ugotovili, da v bakterijah iz vseh rodov, ki smo jih izolirali dva in sedem dni po genski terapiji, ni plazmida pORF-hIL-12. Terapevtskega plazmida pa nam tudi ni uspelo vnesti z elektroporacijo v kompetentne celice sevov bakterij iz rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* in *Streptomyces*, ki smo jih izolirali iz površine kože psov pred terapijo. Ugotovili smo, da je horizontalni genski prenos plazmida pORF-hIL-12 možen le z elektroporacijo v umetno kompetentne bakterije rodov *Escherichia* in *Klebsiella*. Na podlagi dobljenih rezultatov in ob upoštevanju do sedaj znanih dejstev iz literature smo ocenili, da je tveganje za širjenje gena *bla* iz plazmida pORF-hIL-12 v druge, predvsem nesorodne bakterije zanemarljivo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 575:636.09(043.2)  
CX dogs/cancer/mast cell tumors/gene therapy/IL-12/antibiotic resistance/horizontal gene transfer  
AU KRHAČ LEVAČIĆ, Ana  
AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/ČEMAŽAR, Maja (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology  
PY 2013  
TI TESTING THE TRANSFER OF THERAPEUTIC PLASMID FOR GENE THERAPY IN THE SKIN MICROBIOTA OF DOGS WITH MAST CELL TUMORS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)  
NO XIV, 77 p., 23 tab., 16 fig., 3 ann., 102 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Extensive knowledge of the human genome and technological advances in molecular biology enabled also the development of gene therapy. From the perspective of safety the use of gene therapy in clinical practice may be problematic, because of the presence of the genetic code of antibiotic resistance in vectors for the introduction of a therapeutic gene. Genetic code would potentially be transferred to the bacteria that are near the application of gene therapy. Currently, for electrogene therapy with interleukin-12, commercially available therapeutic plasmid pORF-hIL-12 with the record for the human interleukin-12 is used. Plasmid selection marker gene is *bla* gene, with the record for ampicillin resistance. In this master's thesis the possibility of horizontal transfer of *bla* gene *in vitro* and *in vivo* in bacteria, which were isolated from the surface of the dogs' skin before and after the gene therapy, was studied. With the PCR reaction has been found that in all bacteria from all genera, which were isolated 2 and 7 days after the gene therapy the plasmid pORF-hIL-12 was not present. Therapeutic plasmid has not been entered by electroporation into competent cells of strains of bacteria of the following genera *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, which were isolated from the surface of the dogs' skin before treatment. It was found that the horizontal gene transfer of plasmid pORF-hIL-12 is only possible by electroporation into artificial competent bacteria of the genera *Escherichia* and *Klebsiella*. Based on the results, and considering the facts known so far in the literature, we estimated that the risk of the spread of *bla* gene from plasmid pORF-hIL-12 to the other, mostly unrelated bacteria is negligible.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	IX
KAZALO SLIK .....	XI
KAZALO PRILOG .....	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIV
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>2</b>
<b>3 HIPOTEZI.....</b>	<b>2</b>
<b>4 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
4.1 RAK .....	3
4.2 GENSKA TERAPIJA .....	4
<b>4.2.1 Vrste genske terapije .....</b>	<b>4</b>
<b>4.2.2 Genska terapija raka.....</b>	<b>5</b>
4.2.2.1 Imunološki pristop .....	5
4.2.2.2 Molekularni pristop.....	5
<b>4.2.3 Vnos terapevtskega gena v celice .....</b>	<b>5</b>
4.2.3.1 Virusni vektorji .....	6
4.2.3.2 Nevirusni vnos genskega materiala .....	6
4.2.3.2.1 Gola plazmidna DNA.....	6
4.2.3.2.2 Kationski nevirusni dostavní sistemi.....	7
4.2.3.2.3 Fizikalne metode vnosa .....	7
4.2.3.2.4 Elektroporacija .....	7
4.3 GENSKA TERAPIJA RAKA V VETERINARSKI MEDICINI .....	8

<b>4.3.1 Interlevkin-12 (IL-12).....</b>	<b>9</b>
4.3.1.1 Delovanje IL-12 .....	9
4.3.1.2 Zdravljenje raka z IL-12 .....	9
<b>4.3.2 Genska terapija pri mačkah .....</b>	<b>9</b>
<b>4.3.3 Genska terapija pri konjih z IL-12 .....</b>	<b>9</b>
<b>4.3.4 Genska terapija pri psih.....</b>	<b>10</b>
4.3.4.1 Genska terapija pasjih mastocitomov .....	10
4.4 TVEGANJA, POVEZANA Z GENSKIM ZDRAVLJENJEM .....	12
<b>4.4.1 Tveganje, povezano z načinom vnosa virusnih vektorjev.....</b>	<b>12</b>
<b>4.4.2 Tveganje, povezano s terapevtskim genom .....</b>	<b>12</b>
<b>4.4.3 Tveganje, povezano z uporabo gensko modificiranih bakterij (GMB) in geni z zapisom za odpornost proti antibiotikom.....</b>	<b>12</b>
4.4.3.1 Horizontalni prenos genov (HPG) .....	13
4.4.3.1.1 Vnos DNA v bakterije s transformacijo .....	15
4.4.3.1.2 Zakaj je problematika HPG širši zdravstveni problem .....	16
4.4.3.2 Možnost horizontalnega prenosa gena z zapisom za odpornost proti ampicilinu iz terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 v druge bakterije.....	17
<b>5 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>19</b>
5.1. MATERIALI.....	19
<b>5.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1.2 Pribor in oprema .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.3 Klinični izolati in laboratorijski sevi.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1.4 Gojišča .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1.5 Pufri, raztopine in reagenti.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1.6 Začetni oligonukleotidi.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.7 Kompleti .....</b>	<b>26</b>
5.2 METODE .....	27
<b>5.2.1 Izolacija plazmida pORF-hIL-12.....</b>	<b>27</b>

<b>5.2.2 Odvzem brisov kože.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3 Izolacija čistih kultur in ugotavljanje rasti posameznih kultur pri različnih temperaturah in na gojišču LB z dodanim ampicilinom .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.4 Shranjevanje kultur .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.5 PCR .....</b>	<b>28</b>
5.2.5.1 Priprava bakterijskih lizatov .....	28
5.2.5.2 Začetni oligonukleotidi za PCR.....	28
5.2.5.3 Sestava reakcijske mešanice za PCR .....	29
5.2.5.4 Razmere za pomnoževanje s PCR .....	29
<b>5.2.6 Agarozna gelska elektroforeza .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.7 Izolacija in čiščenje PCR-pomnožka iz gela ter sekvenciranje in analiza dobljenega nukleotidnega zaporedja .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2.8 Poskus vnosa terapevtskega plazmida v neobdelane bakterijske celice ter preverjanje zadrževanja plazmidne DNA na površini bakterijskih celic .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2.9 <i>In vitro</i> transformacija DNA pORF-hIL-12 z elektroporacijo v izbrane seve, izolirane iz površine kože psov .....</b>	<b>32</b>
5.2.9.1 Transformacija sevov iz rodu <i>Staphylococcus</i> .....	32
5.2.9.1.1 Priprava elektrokompetentnih celic in elektroporacija po metodi, ki je bila opisana v članku avtorjev Augustina in Götza (1990) .....	32
5.2.9.1.2 Priprava elektrokompetentnih celic in elektroporacija celic po internem laboratorijskem protokolu Charpentier Emmanuelle.....	33
5.2.9.2 Transformacija sevov iz rodu <i>Bacillus</i> .....	34
5.2.9.3 Transformacija sevov iz rodov <i>Acinetobacter</i> , <i>Escherichia</i> (MG 1655, MG 1655 rec <sup>-</sup> , DH5α) in <i>Klebsiella</i> (EXB-S17).....	35
5.2.9.4 Transformacija sevov iz rodov <i>Kocuria</i> in <i>Micrococcus</i> .....	36
5.2.9.5 Transformacija sevov iz rodu <i>Rhodococcus</i> .....	36
5.2.9.6 Transformacija sevov iz rodu <i>Streptomyces</i> .....	37
5.2.9.7 Transformacija sevov iz rodu <i>Arthrobacter</i> .....	37

<b>5.2.10 Preverjanje uspešnosti transformacije .....</b>	<b>38</b>
<b>6 REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
6.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH RODOV, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ POVRŠINE KOŽE PSOV PRED IN PO TERAPIJI .....	40
6.2 PREVERJANJE PRISOTNOSTI TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 V SEVIH, IZOLIRANIH IZ KOŽE PSOV PO TERAPIJI .....	46
6.3 POSKUS VNOSA TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA V BAKTERIJSKE CELICE TER PREVERJANJE ZADRŽEVANJA PLAZMIDNE DNA NA POVRŠINI BAKTERIJSKIH CELIC .....	48
6.4 TRANSFORMACIJE DNA pORF-hIL-12 <i>in vitro</i> Z ELEKTROPORACIJO V IZBRANE SEVE, IZOLIRANE IZ POVRŠINE KOŽE PSOV .....	51
<b>7 RAZPRAVA .....</b>	<b>60</b>
<b>8 SKLEPI.....</b>	<b>67</b>
<b>9 POVZETEK .....</b>	<b>68</b>
<b>10 VIRI .....</b>	<b>69</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Dejavniki, ki vplivajo na HPG (Keese, 2008) .....	14
Preglednica 2. Podatki o zdravljenih psih.....	21
Preglednica 3. Založne in končne koncentracije uporabljenih antibiotikov .....	22
Preglednica 4. Sestava uporabljenih gojišč.....	23
Preglednica 5. Uporabljeni pufri, raztopine in reagenti .....	25
Preglednica 6. Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za 16S rRNA .....	26
Preglednica 7. Začetni oligonukleotidi za preverjanje prisotnosti specifičnega odseka terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 .....	26
Preglednica 8. Začetni oligonukleotidi NDM za preverjanje prisotnosti plazmida ABA NKA (Matjašič, 2012).....	26
Preglednica 9. Program za pomnoževanje gena za 16S rRNA.....	29
Preglednica 10. Program za pomnoževanje specifičnega odseka terapevtskega plazmida .....	30
Preglednica 11. Razmere za pomnoževanja plazmida gena <i>bla</i> <sub>NDM</sub> iz plazmida ABA NKA z reakcijo PCR (Matjašič, 2012).....	39
Preglednica 12. Rodovi bakterij, ki smo jih izolirali iz kože psov pred in po terapiji.....	41
Preglednica 13. Fenotipska opredelitev sevov, izoliranih iz kože psov pred terapijo. Odpornost proti ampicilinu, hemolitičnost ter rast pri temperaturah 30 in 37 °C.....	42
Preglednica 14. Odpornost izolatov, izoliranih iz kože psov po terapiji, proti ampicilinu.....	44

Preglednica 15. Prikaz števila potrebnih spiranj, da odstranimo ostanke plazmidne DNA s površin bakterijskih celic.....	49
Preglednica 16. Rast sevov rodu <i>Staphylococcus</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pUB110 na različnih gojiščih .....	51
Preglednica 17. Rast sevov rodu <i>Bacillus</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pED302 na gojiščih LB.....	52
Preglednica 18. Rast sevov rodu <i>Acinetobacter</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom ABA NKA na gojiščih LB.....	52
Preglednica 19. Rast sevov rodu <i>Escherichia</i> in <i>Klebsiella</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pUC19 na gojiščih LB....	53
Preglednica 20. Rast sevov rodov <i>Kocuria</i> in <i>Micrococcus</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojiščih SOB .....	53
Preglednica 21. Rast sevov rodu <i>Rhodococcus</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojiščih BHI + ME.....	54
Preglednica 22. Rast sevov rodu <i>Streptomyces</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojiščih TSBP .....	54
Preglednica 23. Rast sevov rodu <i>Arthrobacter</i> po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojiščih LB .....	54

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz tumorja in mesta odvzema brisov. Tumor in mesto odvzema brisa pred terapijo (A), dva dni po terapiji (B) in sedem dni po terapiji (C). ....	27
Slika 2: Rast bakterij, odvzetih iz kože pasjih pacientov. Rast na gojišču LB (A) in na krvnem agarju (B). ....	27
Slika 3: Standardni lestvici fragmentov DNA, ki smo jih uporabili pri agarozni gelski elektroforezi - 1 kb DNA Ladder (A) in 1 kb DNA Ladder Plus (B) ....	30
Slika 4: Dodajanje terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 k neobdelanim kolonijam testiranih bakterij ....	31
Slika 5: Slika agarognega gela po elektroforezi različnih PCR-pomnožkov gena za 16S rRNA. Z oznakami od F1 do F16 so označeni PCR-pomnožki iz bakterijskih lizatov psa F. 40	
Slika 6: Preverjanje prisotnosti odseka plazmida pORF-hIL-12 v sevih, izoliranih po terapiji .....	47
Slika 7: Primer slike agarognega gela PCR-pomnožkov za preverjanja prisotnosti plazmida pORF-hIL-12 po transformaciji neobdelanih bakterijskih celic .....	49
Slika 8: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji po 1. in 2. protokolu.....	55
Slika 9: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Bacillus</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji .....	55
Slika 10: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Acinetobacter</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji.....	56

Slika 11: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Kocuria</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji .....	56
Slika 12: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Micrococcus</i> in bakterij rodu <i>Rhodococcus</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji .....	57
Slika 13: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Streptomyces</i> in bakterij rodu <i>Arthrobacter</i> , zraslih po <i>in vitro</i> transformaciji .....	57
Slika 14: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Escherichia</i> po <i>in vitro</i> transformaciji.....	58
Slika 15: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu <i>Klebsiella</i> po <i>in vitro</i> transformaciji.....	58
Slika 16: Slika agaroznega gela po elektroforezi plazmidne DNA pORF-hIL-12, ki smo jo izolirali iz transformant sevov EXB-S17, MGrec-, MG, 7FA in DH5 $\alpha$ .....	59

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidno zaporedje in slika plazmida pORF-hIL-12. Interlevkin-12 je označen sivo poudarjeno, medtem ko je selekcijski gen za odpornost proti ampicilinu označen s črno barvo. Celoten plazmid je velik 5048 bp.

Priloga B: Nukleotidna zaporedja za identifikacijo izolatov, izoliranih iz kože psov pred terapijo. Pred zaporedjem sta navedena delovna oznaka izolata in ime identificirane kulture.

Priloga C: Nukleotidna zaporedja za identifikacijo izolatov, izoliranih iz kože psov po terapiji. Pred zaporedjem sta navedena delovna oznaka izolata in ime identificirane kulture.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Amp</b>	antibiotik ampicilin
<b>bp</b>	bazni pari v dvočleni vijačnici nukleinske kisline
<b>BHI</b>	gojišče Brain heart infusion broth
<b>BM</b>	gojišče Basic medium
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin
<b>CRM</b>	gojišče za kultivacijo sevov iz rodu <i>Streptomyces</i>
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EMA</b>	Evropska agencija za zdravila
<b>FDA</b>	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano
<b>GC</b>	gvanin, citozin
<b>GMB</b>	gensko modificirane bakterije
<b>GSO</b>	gensko spremenjeni organizmi
<b>HPG</b>	horizontalni prenos genov
<b>IFN-γ</b>	interferon gama
<b>IL-12</b>	interlevkin 12
<b>IP10</b>	interferon inducibilni protein-10
<b>kb</b>	kilobazni pari, 1000 baznih parov v dvočleni vijačnici DNA
<b>LB</b>	gojišče Luria-Bertani
<b>MGE</b>	mobilni genski elementi
<b>NDM</b>	metalo-β-laktamaza iz New Delhiya
<b>PBMC</b>	mononuklearni levkociti v periferni krvi pri psih
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>pDNA</b>	plazmidna deoksiribonukleinska kislina
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>SMMP50</b>	gojišče za kultivacijo sevov iz rodu <i>Staphylococcus</i>
<b>SOB</b>	gojišče Super optimal broth
<b>SOC</b>	gojišče Super optimal broth z dodatkom glukoze
<b>TSBP</b>	gojišče Tryptic soy broth
<b>vrt.</b>	vrtljajev

---

## 1 UVOD

Obširnejše znanje o človekovem genomu in tehnološki napredek na področju molekularne biologije omogočata tudi razvoj genske terapije, vključno z gensko terapijo raka in razvojem DNA-cepiv. Eden izmed glavnih ciljev raziskovalcev na področju genske terapije in DNA-cepiv je razvoj varnega in učinkovitega sistema za vnos genov v tarčne celice, ki mnogokrat predstavlja eno od ključnih ovir za uspešnost terapije. Za vnos DNA v tarčne celice se trenutno največkrat uporablajo virusni vektorji ali molekule plazmidne DNA, ki jo vnesemo v tarčne celice z različnimi kemijskimi ali fizikalnimi postopki, med katerimi je elektroporacija med najbolj uspešnimi. Plazmidno DNA, ki jo uporabljamo za vnos v tarčne celice, pridobimo s pomnoževanjem v bakterijskih gostiteljskih celicah, kjer se kot selekcijski marker največkrat uporablja odpornost proti antibiotikom. Z vidika varnosti uporabe genske terapije v klinični praksi je odpornost proti antibiotikom skrb vzbujajoča zaradi možnosti horizontalnega prenosa genskega zapisa za odpornost v druge bakterije. Agenciji FDA in EMA priporočata uporabo vektorjev z zapisom za odpornost proti antibiotikom, ki se le redko ali sploh ne uporablajo za zdravljenje humanih okužb. Trenutno tem zahtevam ustreza samo gen za odpornost proti kanamicinu. Genska terapija s plazmidom, ki ima zapis za citokin interlevkin-12 in ga vnesemo v tarčne celice s fizikalnim načinom vnosa – elektroporacijo (elektrogenska terapija) – se je izkazala za uspešno za zdravljenje različnih vrst raka, tako v predkliničnih študijah kot tudi v humani klinični študiji zdravljenja malignega melanoma in veterinarski klinični študiji na mastocitomih pri psih. Trenutno se za elektrogensko terapijo z interlevkinom-12, ki jo izvajajo na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, uporablja komercialno dostopna plazmidna DNA z zapisom za humani interlevkin-12. Plazmidni selekcijski označevalec je odpornost proti ampicilinu. Terapija se izvaja na kožnih in podkožnih mastocitomih, v katere se intratumorsko injicira plazmidna DNA, čemur sledi elektroporacija. Uspešnosti zdravljenja se sledi z merjenjem velikosti tumorjev v rednih časovnih intervalih po terapiji, medtem ko se varnosti uporabe terapevtskega plazmida sledi s spremeljanjem morebitnih neželenih stranskih pojavov in ugotavljanjem prisotnosti plazmida na koži psov v različnih intervalih po terapiji.

## 2 NAMEN DELA

V magistrskem delu smo preverili prisotnost odsekov plazmidne DNA v gojljivih aerobnih bakterijah, ki smo jih po terapiji izolirali iz okolice mesta aplikacije. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali lahko s transformacijo vnesemo terapevtski plazmid z zapisom za odpornost proti ampicilinu v kompetentne celice bakterijskih sevov, ki smo jih pred gensko terapijo izolirali iz kože zdravljenih psov v bližini mesta aplikacije terapevtskega plazmida. Tako smo ugotavljeni možnost horizontalnega genskega prenosa *in vivo* in *in vitro* ter na podlagi rezultatov ocenili tveganje za širjenje genov z zapisom za odpornost proti ampicilinu iz terapevtskega plazmida, kot možno posledico genskega zdravljenja, v okolje.

## 3 HIPOTEZI

1. Plazmida z genom za odpornost proti ampicilinu po genski terapiji ne izsledimo v aerobnih, gojljivih bakterijah, ki jih lahko izoliramo iz neposredne bližine aplikacije genske terapije po dveh in sedmih dneh.
2. Z *in vitro* transformacijo ne moremo vnesti terapevtskega plazmida v kompetentne bakterije, ki smo jih izolirali iz površine pasje kože. Plazmid lahko vnesemo z elektroporacijo le v seve bakterije rodu *Escherichia*.

## 4 PREGLED OBJAV

### 4.1 RAK

Rak je skupina bolezni, ki nastanejo zaradi različnih sprememb na ravni zgradbe in izražanja genoma. Za rak je značilna nekontrolirana rast spremenjenih celic v različnih organih, brez fiziološke funkcije za ta organ, pri tem pa so celice sposobne tudi invazije v druga tkiva (Ruddon, 2007). Tumorske celice se lahko razširijo v druge dele telesa prek limfnega in krvnega obtoka. Obstaja več kot 100 različnih vrst tumorjev. Večina tumorjev je poimenovanih po organu ali tipu celice, v kateri se začne. Posamezne vrste tumorjev je možno razdeliti v širše kategorije. Glavne kategorije tumorjev so:

- karcinomi – zrastejo iz epitelnih celic, ki gradijo večino telesnih organov,
- sarkomi – zrastejo iz celic opornih tkiv (v vezivu, maščevju, kosteh in hrustancu),
- levkemije – rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov,
- limfomi in mielomi – rakaste bolezni limfatičnega sistema,
- rak centralnega živčnega sistema – tumorji, ki se začnejo v tkivih v možganih in hrbtenjači (Novaković in sod., 2009; Ruddon, 2007; Franks in Teich, 1997).

Zdravljenje raka je odvisno od vrste in stadija raka, možnih neželenih učinkov in splošnega stanja bolnika. Možen je multidisciplinarni pristop zdravljenja oz. združevanje različnih vrst terapij. Najpogosteje metode zdravljenja so kirurška (odstranitev tumorja in okoliškega tkiva), radioterapija (uporaba rentgenskih žarkov ali drugih delcev, ki povzročajo ionizacijo v celici) in kemoterapija (uporaba zdravil za ubijanje rakavih celic). Zaradi različnih stranskih učinkov in potrebe po izboljšanju obstajajo še druge možnosti zdravljenja tumorjev, kot so: tarčno zdravljenje (ciljanje za rak specifičnih genov in beljakovin ali okoliškega tkiva, ki prispevajo k rasti in preživetju raka, pri tem pa minimalno škodujejo normalnim celicam), imunoterapija (okrepi imunski sistem telesa za boj proti raku), hormonska terapija (zmanjšanje količine hormonov v telesu) in uporaba matičnih celic/presaditev kostnega mozga (boleli kostni mozeg se nadomesti s hematopoetskimi matičnimi celicami iz krvnega obtoka ali kostnega mozga). Med novejše metode zdravljenja raka spada tudi genska terapija (Franks in Teich, 1997; Jezeršek Novaković in Pajk; 2009; Schwab, 2011).

## 4.2 GENSKA TERAPIJA

Genska terapija je sodoben pristop zdravljenja ali preprečevanja različnih genetskih in negenetskih bolezni (Schwab, 2011; Pavlin in sod., 2012). V zadnjih dveh desetletjih sta na tem področju opazna ogromen napredok ter prenos tega terapevtskega pristopa iz predkliničnih študij na klinično raven, tako v humani kot tudi veterinarski medicini (Čemažar in sod., 2011). Zaenkrat je največ kliničnih študij genske terapije, približno dve tretjini, usmerjenih v gensko terapijo raka (Ginn in sod, 2013; Redberry, 2005).

Pri genski terapiji želimo na najmanj škodljiv in toksičen način ter selektivno v tarčne celice vnesti genski material (DNA) (Akhtar in sod., 2011; Kreft in sod., 2007; Scanlon, 2004; Pavlin in sod., 2012). Genske bolezni so lahko prirojene (dedne), kot je cistična fibroza, in pridobljene, kot je rak. Terapevtski učinek se doseže s popravljanjem genske napake ali s čezmernim izražanjem terapevtsko učinkovitih proteinov. Pri tem moramo biti pozorni na številne dejavnike, kot so varnost genskih produktov in vektorskih sistemov, vnos terapevtskih genov, selektivno ciljanje, celični promet, aktivnost terapevtskih proteinov ter uravnavanje ravni in trajanja izražanja genov. Selektivno zdravljenje, popravljanje genskih vzrokov bolezni ter dolgorajno delovanje po enkratnem vnosu zdravila so največje prednosti zdravljenja z gensko terapijo (Kreft in sod., 2007).

### 4.2.1 Vrste genske terapije

Pri genski terapiji lahko za popravljanje okvarjenih genov in spremembo izražanja genov uporabljam naslednje pristope:

- zamenjava nefunkcionalnega gena z nespecifično vstavitvijo funkcionalnega gena – v kateri koli del genoma vključimo gen s promotorjem (enostavno, ampak neuporabno za velike gene in pri dominantnih boleznih);
- vstavitev funkcionalnega gena na mesto okvarjenega – s homologno rekombinacijo okvarjeni gen zamenja novi (pomembno je dobro načrtovanje, da poteče homologna rekombinacija);
- popravljanje z reverzno mutacijo – funkcionalna oblika gena nastane s spremembo okvarjenega mesta v nefunkcionalnem genu;
- sprememba v uravnavanju določenega gena – utišanje izražanja okvarjenega gena (Kreft in sod., 2007; Patil in sod., 2012).

#### **4.2.2 Genska terapija raka**

Z gensko terapijo lahko pri zdravljenju rakavih bolezni popravimo oziroma kompenziramo posledice genetskih okvar, značilne za rakave celice. Cilj genske terapije raka je specifično ciljati tumorske celice in čim manj prizadeti normalne nemaligne celice. V tem se razlikuje od ustaljenih metod zdravljenja raka, ki pogosto prizadenejo tudi zdrave celice, kar lahko vodi do lokalnih in sistemskih nezaželenih učinkov (Pavlin in sod., 2006; Selkirk, 2004).

Zaradi kompleksne narave raka klasičen pristop genskega zdravljenja ni primeren. Zato imamo pri genski terapiji raka namesto vzpostavljanja normalnega genotipa več možnih pristopov (Kreft in sod., 2007). Kljub medsebojnemu prepletanju lahko pristope razdelimo na imunološke in molekularne. Poleg tega je posamezne pristope možno kombinirati z že obstoječimi metodami zdravljenja (El-Aneed, 2004).

##### **4.2.2.1 Imunološki pristop**

Imunoterapija je genska terapija, ki spreminja imunski odziv bolnika. Tumorske celice so po naravi imunogene, vendar so se sposobne izogniti imunskemu sistemu, kar pomeni, da imunski odziv organizma ni dovolj za prepoznavanje in ubijanje tumorskih celic. Tumorske celice imajo to sposobnost zaradi izločanja imunskih zaviralcev, znižanega izražanja antigenov ali molekul poglobitnega histokompatibilnostnega sistema in pomanjkanja kostimulacije (Kreft in sod., 2007; El-Aneed, 2004).

##### **4.2.2.2 Molekularni pristop**

Molekularni pristop pri genski terapiji je možen zaradi spremenjenega izražanja nekaterih genov v tumorskih celicah, kar pa je lahko posledica mutacij ali epigenetskih sprememb. S ciljanjem teh genov (onkogeni in tumor supresorski geni) zaustavimo celični cikel ali povzročimo apoptozo (programirana celična smrt). Poleg tega lahko uporabimo tudi samomorilske gene ali možnost inhibicije aktivatorjev angiogeneze in vstavitev inhibitorjev angiogeneze. Zadnji molekularni pristop genske terapije je onkolitska viroterapija oz. genska sprememba virusa, ki ga usmerimo proti tumorskim celicam (Scanlon, 2004; Kreft in sod., 2007; El-Aneed, 2004; Schwab, 2011).

#### **4.2.3 Vnos terapevtskega gena v celice**

Ključnega pomena za gensko terapijo je dostava želenega gena v celice. Protokol za *in vivo* gensko terapijo mora biti varen, učinkovit in ponovljiv. Terapija ne sme imeti stranskih

učinkov za organizem, kot sta vpliv na genom gostitelja in dodatna kancerogena transformacija celic ali toksičnost. Idealni vnašalni sistem mora zagotoviti dolgotrajno in stabilno izražanje vnesenih genov v ciljnem tkivu. Pridobivanje terapevtskega vektorja mora biti relativno enostavno, tudi v večjih količinah, ter cenovno ugodno (Akhtar in sod., 2011; Gardlik in sod., 2005). Odvisno od lokacije oziroma dostopnosti tumorja in prisotnosti oddaljenih zasevkov ter sposobnosti dostavnih sistemov lahko gene vnesemo sistemsko (v krvni obtok – pri oddaljenih zasevkih) ali lokalno (v mišico ali tumor) (Pavlin in sod., 2006). Danes poznamo virusne vektorje za gensko transdukциjo in nevirusne tehnike za gensko transfekcijo (Schwab, 2011; Gardlik in sod., 2005).

#### 4.2.3.1 Virusni vektorji

Najpogosteje uporabljeni vektorji so virusi z ustrezno spremenjenim genomom. Pri pripravi teh vektorjev se odstranijo geni, povezani z virulenco, obenem pa se v vektorje vstavijo terapevtski geni. Prednost pred nevirusnimi vektorji je večja učinkovitost transdukcije v primerjavi z nevirusnimi metodami. Vnos virusnih vektorjev v telo lahko povzroči stranske učinke, kot je toksičnost, imunski ali vnetni odziv, problematična pa sta tudi nadzor izražanja genov in vstavitev v neprimerno mesto na genomu (Akhtar in sod., 2011; Nayerossadat in sod., 2012; Gardlik in sod., 2005).

#### 4.2.3.2 Nevirusni vnos genskega materiala

Prednosti nevirusnega vnosa genskega materiala so enostavnejša izdelava, večja prilagodljivost pri izdelavi, bistveno večja kapaciteta za vključitev tuje DNA, večja varnost in manjša imunogenost v razmerah *in vivo*. Uporabimo jih lahko v več zaporednih aplikacijah. Največja slabost takšnega načina vnosa je manjša učinkovitost transfekcije celic (Scanlon, 2004; Cegnar in sod., 2007; Nayerossadat in sod., 2012; Gardlik in sod., 2005).

##### 4.2.3.2.1 Gola plazmidna DNA

Najbolj enostaven in najvarnejši, vendar relativno neučinkovit pristop genske terapije je sistemski ali lokalni vnos terapevtskega gena z neposrednim injiciranjem gole plazmidne DNA. Pri tem je izražanje vnesenih genov zelo nizko, vendar še vedno dovolj visoko za uporabo pri genskih vakcinah. Relativno neučinkovita transfekcija po sistemski aplikaciji je posledica hitre razgradnje z nukleazami in odstranitve s fagocitozo (Čemažar in sod., 2011; Akhtar in sod., 2011; Wells, 2004; Pavlin in sod., 2006; Nayerossadat in sod., 2012; Gardlik in sod., 2005). Pri načrtovanju in izdelavi pDNA moramo upoštevati vpliv bakterijskih

zaporedij, ki so na vektorju, na izražanje transgena in pristope k zmanjševanju njihovih učinkov (Akhtar in sod., 2011). Plazmidni vektorji so v celoti sestavljeni iz kovalentno zaprtega kroga DNA in nimajo dodatno vezanih proteinov, ki bi lahko bili imunogeni. Učinkovitost vnosa vektorja v celice povečajo kemični načini vnosa in/ali fizikalne metode (Cegnar in sod., 2007; Pavlin in sod., 2006).

#### 4.2.3.2.2 Kationski nevirusni dostavnici sistemi

Golo DNA lahko organizem hitro odstrani, zato jo lahko vgradimo v kationske nevirusne dostavne sisteme, kot so kationski lipidi in polimeri. Neto naboj tega kompleksa je pozitiven, kar omogoči učinkovito interakcijo z negativno nabitimi celičnimi membranami in internalizacijo, ki v glavnem poteka z endocitozo (Cegnar in sod., 2007; Nayerossadat in sod., 2012; Gardlik in sod., 2005).

#### 4.2.3.2.3 Fizikalne metode vnosa

Vse fizikalne metode izboljšajo vnos genov, tako da dostavijo plazmidno DNA bližje celični membrani in/ali povzročijo začasne mikroskopske spremembe celične membrane, zaradi česar se poveča prehod plazmidov v celico (Wells, 2004). Nekompleksirano DNA lahko v celico vnašamo s pomočjo mikroinjeciranja, hidroporacije, elektroporacije, uporabe ultrazvoka in biobalistike (Cegnar in sod., 2007; Nayerossadat in sod., 2012).

#### 4.2.3.2.4 Elektroporacija

Elektroporacija ali elektropermeabilizacija pri ustrezni jakosti električnega polja povzroči omejeno destabilizacijo membrane, kar ustvari pore, ki se ohranijo ves čas delovanja polja, poleg tega pa povzroči elektroforezno gibanje DNA, kar pripomore k vnosu DNA. Električno polje se ustvari z elektrodami, ki jih lahko vstavimo v tkivo ali postavimo na površino tkiva (Cegnar in sod., 2007; Gehl, 2003). Pri elektroporaciji s pomočjo zunanjega električnega polja ustvarimo vsiljeni transmembranski potencial. Do povečane prepustnosti celične membrane pa pride, ko ta potencial doseže kritično vrednost in preseže določen prag. Prepustnost celične membrane se poveča, ko so pore dovolj velike in jih je dovolj, da v celično notranjost vstopijo molekule, za katere je celična membrana sicer nepropustna. Če vsiljeni transmembranski potencial preide prek t. i. irreverzibilne pragovne vrednosti, lahko povzroči uničenje celice, če pa uporabimo natančno določene električne pulze, je struktturna sprememba celice le začasna in reverzibilna (Gehl, 2003; Pavlin in sod., 2005).

Elektroporacija je že uveljavljena metoda *in vitro* za povečanje učinkovitosti vnosa različnih molekul (RNA, DNA, oligonukleotidi, barvila, ioni, kemoterapevtska zdravila) v različne vrste celic. Pri tem razlikujemo:

- elektrokemoterapijo – uporaba nadzorovanih električnih impulzov na tumorske celice za bolj učinkovit vnos in citotoksičnost kemoterapevtskih zdravil, kot so bleomicin in cisplatin (že v uporabi v klinični praksi);
- elektrogensko terapijo – injiciranje terapevtske DNA v tarčno tkivo ob uporabi električnih pulzov (klinične raziskave v humani in veterinarski medicini) (Čemažar in sod., 2011; Serša in sod., 2009).

Elektrogenska terapija je bila uporabljena že leta 1990. Od takrat je bilo uspešno transfeciranih *in vivo* več različnih vrst tkiv z uporabo tega pristopa, vključno s tumorji, skeletnimi mišicami, kožo in jetri (Čemažar in sod., 2011).

#### 4.3 GENSKA TERAPIJA RAKA V VETERINARSKI MEDICINI

Klinične raziskave na domačih živalih oziroma pri hišnih ljubljenčkih nimajo samo ključne vloge pri napredku veterinarske medicine, temveč zagotavljajo tudi neprecenljive podatke za humane klinične raziskave (Čemažar in sod., 2011). Študije genskih terapij, ki potekajo na majhnih laboratorijskih živalih, ne moremo vedno enostavno prenesti na ljudi, kot bi želeli, zato so predklinični modeli z velikimi živali uporabni kot vmesni korak med študijami na glodavcih in uporabo pri človeku (Chuang in sod., 2009; Pavlin in sod., 2012).

Uporaba velikih živali, kot so psi, mačke, konji in govedo, kot eksperimentalnih modelov za nove tehnike zdravljenja, ima mnogo prednosti pred uporabo laboratorijskih živali. Te živali, posebej hišne živali in ljudje, si delijo enak življenjski prostor in so zato izpostavljene podobnim okoljskim rizičnim dejavnikom za razvoj določene bolezni. Imajo mnogo anatomskev in fiziološkev podobnosti z ljudmi ter podobne klinične znake kot bolni ljudje. Psi, mačke in konji imajo veliko daljšo življenjsko dobo kot laboratorijske živali in lahko naravno dosežijo starost, ki je pogosto povezana z večjim tveganjem za razvoj rakavih obolenj. Poskusi na velikih živalih pomagajo prepoznati potencial o učinkovitosti in varnosti genskega prenosa, ki ne more biti določen na laboratorijskih živalih (Pavlin in sod., 2012).

### **4.3.1 Interlevkin-12 (IL-12)**

Interlevkin-12 je topen citokin, ki ga antigen predstavitevne celice proizvajajo kot odziv na patogene, aktivirane celice T in sestavine vnetnega zunajceličnega matriksa (Bael in Gollob, 2007; Colombo in Trinchieri, 2002). Ugotovljeno je, da je ta citokin potreben za odpornost proti bakterijam in znotrajceličnim parazitom, kakor tudi za vzpostavitev za organ specifične avtoimunosti (Del Vecchio in sod., 2007).

#### **4.3.1.1 Delovanje IL-12**

IL-12 ima pomembno vlogo pri regulaciji celičnega imunskega odziva, kot je stimulacija produkcije IFN- $\gamma$  s strani celic ubijalk in T-limfocitov, kar povratno spodbuja proizvodnjo IL-12, aktivacijo celic naravnih ubijalk, diferenciacijo citotoksičnih limfocitov T v Th1, poleg tega pa stimulira proliferacijo perifernih mononuklearnih krvnih celic in ima antiangiogeno delovanje prek aktivacije indukcije IFN- $\gamma$ , ki regulira kemokine, kot sta IP10 in monokin Mig, ki so vključeni v zaviranje angiogeneze. Poleg tega IL-12 dodatno povečuje odziv CD4 + Th1, ki vodi do aktivacije specifičnega B celičnega odziva (Del Vecchio in sod., 2007; Lee in Margolin, 2011; Chuang in sod., 2009; Colombo in Trinchieri, 2002).

#### **4.3.1.2 Zdravljenje raka z IL-12**

Za zdravljenje raka so najprej uporabili rekombinantni protein IL-12 (Pavlin in sod., 2012), medtem ko genska terapija predstavlja napreden način uporabe in izboljšano delovanje IL-12. Mnogo študij navaja možnost kombinacije protitumorske terapije z IL-12 z drugimi, kot sta elektrokemoterapija, kombinacija z drugimi terapevtskimi geni (IL-18) ali s standardnimi terapijami (Čemažar in sod., 2010; Wells, 2004).

### **4.3.2 Genska terapija pri mačkah**

Večina primerov genske terapije pri mačkah obravnava zdravljenje raka (najpogosteje fibrosarkoma) in tudi nekaterih nevroloških bolezni, mnogo dednih bolezni in bolezni srca (Pavlin in sod., 2012).

### **4.3.3 Genska terapija pri konjih z IL-12**

Konji so najbolj pogosto uporabljeni velike živali kot model za osteoarthritis in melanom, ki ima podobne histološke in imunohistološke značilnosti kot melanomi pri ljudeh. Obstaja več študij direktnega injiciranja IL-12 brez dodatka kakršnekoli fizikalne ali kemične metode, pri

tem pa so opazili zmanjšanje velikosti tumorja ter odsotnost stranskih učinkov (Pavlin in sod., 2012).

#### **4.3.4 Genska terapija pri psih**

Psi so najpogosteje uporabljeni živali za raziskovanje genske terapije. Imajo imunski sistem, ki je zelo podoben človeškemu, kar je velika prednost pred drugimi živali. Zaradi uspešnega sekvenciranja genoma lahko opredelimo različne genetske nepravilnosti pri psih (Pavlin in sod., 2012). Psi so genetsko bolj tesno povezani z ljudmi kot glodavci; živijo v enakem okolju kot ljudje in imajo številne podobne fiziološke funkcije, vključno s podobnim metabolizmom zdravil. Poleg tega se pri domačih psih spontano razvijejo različni tumorji, ki so biološko podobni človeškim (ne-Hodgkinov limfom, melanom in osteosarkom), zato so spontani tumorji psov odličen model za raziskovanje novih terapij. Pri psih sta v primerjavi s človekom močno pospešena kinetika rasti in napredovanje tumorjev, kar pomeni, da lahko ocenimo rezultate zdravljenja v bolj realističnem časovnem okviru (Chuang in sod., 2009). O zdravljenju raka z uporabo različnih terapevtskih genov, kot so bakterijski superantigeni in citokini, pri psih je bilo objavljenih veliko študij (Pavlin in sod., 2011; Reed in sod., 2010; Thamm in sod., 2003; Bianco in sod., 2003; Dow in sod., 1998; Hogge in sod., 1999; Hogge in sod., 1998). Skupen zaključek vseh teh študij, v katerih preučujejo gensko terapijo z IL-12, je, da poleg dobrega protitumorskga kliničnega učinka intratumoralna ali intramuskularna elektrogenska terapija z IL-12 ne povzroča nobenih pomembnih stranskih učinkov (Pavlin in sod., 2012). V prihodnosti so potrebne izpopolnitve protokola, povezane s preiskovanjem kinetike sproščanja citokinov, optimalnim odmerkom plazmida, številom potrebnih ponovitev zdravljenja in učinkom kombinacij z drugimi protokoli zdravljenja (npr. lokalna intratumoralna dostava plazmida ali elektrokemoterapija) (Čemažar in sod., 2011).

##### **4.3.4.1 Genska terapija pasjih mastocitomov**

Z 21-odstotnim deležem uvrščamo mastocitom med najpogostejše maligne kožne tumorje pri psih (Pavlin in sod., 2011). To so tumorji z izjemno spremenljivim obnašanjem (od tumorjev z zelo nizko stopnjo malignosti do zelo invazivnih tumorjev z visokim metastatskim potencialom), zaradi česar sta lahko določanje kliničnega stadija bolezni in odločanje o ustrezni vrsti zdravljenja zelo težka (Čemažar in sod., 2010; Pavlin, 2010). Zdravljenje mastocitomov je odvisno od prognostičnih dejavnikov, predvsem od histološkega razreda tumorja in klinične faze bolezni. Tako lahko izberemo kirurško terapijo, če je mogoče, ali pa radio- oziroma kemoterapijo (Serša in sod., 2006; Pavlin in sod., 2011).

Za zdravljenje se uporablja tudi elektrogenska terapija. Pavlin in sod. (2011) so uporabili intratumoralno elektrogensko terapijo, pri kateri so v tumor injicirali vodno raztopino plazmida z zapisom za humani IL-12, čemur je sledila aplikacija električnih pulzov s pomočjo elektrod in generatorja električnih pulzov. V raziskavi so spremljali tudi biološko varnost uporabe genske terapije, tako da so v različnih časovnih intervalih ugotavljali prisotnosti terapevtskega plazmida na koži psov ter s tem povezano potencialno nevarnost prenosa genov iz terapevtskega plazmida v naravno prisotne bakterije na koži pri psih.

Plazmid pORF-hIL-12 (InvivoGen, Francija), z zapisom za humani IL-12, ki je sestavljen iz dveh podenot IL-12 p40 in p35, povezanih z linkerjem, je bil izbran v skladu s podatki, ki kažejo, da imajo pasji in humani IL-12 približno 90 % genetske podobnosti (Büttner in sod., 1998). Humani IL-12 je v razmerah *in vitro* biološko aktiven, saj aktivira proliferacijo in imunski odgovor mononuklearnih levkocitov v periferni krvi pri psih (PBMC), kar vodi do zaključka, da bi podobne imunološke učinke lahko izzvali tudi *in vivo* (Pavlin in sod., 2008; Chuang in sod., 2009; Pavlin in sod., 2012). Genska terapija je bila narejena pri psih v splošni anesteziji, ki je bila inducirana s propofolom in vzdrževana z isofluranom. Serumske koncentracije genskega produkta po transferju ne dosegajo koncentracij, primerljivih z aplikacijo rekombinantnega IL-12, ki so se izkazale za toksične. Z izražanjem IL-12 se okrepi imunski odziv psa na tumor, kar poveča možnost za uspešno kirurško odstranitev tumorja in nadaljnje zdravljenje. S to raziskavo so dokazali, da ima intratumoralna elektrogenska terapija z IL-12 v pasjih mastocitomih dobre lokalne protitumorske učinke brez opaznih neželenih učinkov (Pavlin in sod., 2011).

## 4.4 TVEGANJA, POVEZANA Z GENSKIM ZDRAVLJENJEM

### 4.4.1 Tveganje, povezano z načinom vnosa virusnih vektorjev

Nekateri virusni vektorji lahko poleg rakavih celic okužijo tudi zdrave celice. V določenih razmerah to lahko povzroči sekundarni nastanek rakavih celic. Poleg tega stimulirajo imunski sistem bolnika (povzročijo imunski ali vnetni odziv). Virusni vektor se lahko potencialno prenese v okolje ali na druge posamezni, kar bi lahko bilo izhodišče za razvoj novih virusnih bolezni pri ljudeh. Zato je obstoječe virusne vektorje pri ljudeh potrebno uporabljati z veliko previdnosti (Pavlin in sod., 2006, Akhtar in sod., 2011; Kouraklis, 2000; Scanlon, 2004).

### 4.4.2 Tveganje, povezano s terapevtskim genom

Pri *in utero* somatski genski terapiji obstaja tveganje, da se nekaj DNA vnese v zarodne celice, kar lahko privede do dednih sprememb (Akhtar in sod., 2011; Couttele in Rodeck, 2002). Prevelika količina produkta terapevtskega gena, ki lahko nastane zaradi čezmernega izražanja, je lahko toksična. Pri vstavitvi terapevtskega gena v genom se gen lahko vstavi v napačno lokacijo v DNA, kar lahko povzroči nastanek raka ali druge poškodbe (insercijske mutacije, ki lahko poškodujejo ključen gospodinjski gen ali izbrišejo učinke tumor supresorskih genov) (Akhtar in sod., 2011; Kouraklis, 2000). Pri uporabi citokinov kot terapevtskih genov so potrebne ponovitvene sistemske aplikacije v visokih dozah, kar lahko vodi v različne stranske učinke (Pavlin in sod., 2006).

### 4.4.3 Tveganje, povezano z uporabo gensko modificiranih bakterij (GMB) in geni z zapisom za odpornost proti antibiotikom

Čeprav je bilo ugotovljeno, da uporaba GMB ne predstavlja večje nevarnosti od uporabe originalnih nemodificiranih organizmov, obstaja še nekaj pomislekov glede vprašanja varnosti, med katerimi je tudi možnost prenosa genov iz GMB v okoljske bakterije, posebej prenos v patogene bakterije (Netherwood in sod., 1999). Horizontalni prenos genov (HPG) iz GMB lahko podeli organizmu novo lastnost, ki je lahko vir potencialne nevarnosti za zdravje ljudi ali okolje (Keese, 2008). Gen z zapisom za odpornost proti antibiotiku se lahko s HPG prenese v druge bakterije, odvisno od mesta aplikacije genske terapije (Martinez, 2008).

#### 4.4.3.1 Horizontalni prenos genov (HPG)

Horizontalni (lateralni) prenos genov je stabilna izmenjava genskega materiala med različnimi vrstami, rodovi ali celo različnimi bakterijskimi debli v isti populaciji (Keese, 2008; Cruz in Davies, 2000; Palaniswami, 2011).

Horizontalni prenos genov med nesorodnimi vrstami omogočajo mobilni genetski elementi (MGE). MGE so segmenti DNA, ki kodirajo encime in druge proteine, ki posredujejo gibanje DNA v genomu (intracelularna mobilnost) ali med bakterijskimi celicami (medcelična mobilnost) (Frost in sod., 2005). Med MGE uvrščamo: plazmide, bakteriofage, transpozone, insercijske sekvence, integrone, kasetne gene in genomske otoke (Cruz in Davies, 2000; Levy in Marshall, 2004). MGE so bili opisani v genomih vseh prokariontov in evkariontov (Keese, 2008). Po prenosu genetske informacije z MGE se lahko spremenijo fenotipske lastnosti recipienta, zaradi genskih zapisov na prenesenih genih ali kot posledica vključitev MGE v recipientski genom (Cruz in Davies, 2000; Levy in Marshall, 2004).

Pri bakterijah so dobro opisani trije mehanizmi HPG: transformacija (vnos gole DNA), transdukacija (prenos bakterijske DNA z bakteriofagi) in konjugacija (prenos genov s plazmidom prek proteinskega pila) (Dröge in sod., 1998; Frost in sod., 2005). Transpozicijski elementi so genski elementi, ki se lahko premikajo z enega mesta na drugo znotraj ene molekule DNA. Lahko so vstavljeni v DNA konjugativnih plazmidov, kar v večini primerov omogoča njihovo mobilnost v druge celice. Integroni so genetski elementi, v katere se z rekombinacijo vstavlja posamezne genske kasete. Lahko so del plazmidov ali transpozicijskih elementov, v bakterijsko celico pa lahko vstopijo tudi s transformacijo DNA, ki ima vključen integron. Genski zapisi za odpornost proti antibiotikom, ki so pogosto del navedenih mobilnih elementov, se tako s HPG lahko prenesejo v druge bakterije (Frost in sod., 2005; Hall in Collis, 1995).

Uspešnost HPG je odvisna od načina in učinkovitosti prenosa DNA iz donorske v recipientsko celico, vključitve prenesene DNA v genom recipienta in izražanja genov, ki so na preneseni DNA. Pomembno je tudi vzdrževanje vključenih genov v recipientu, ki je odvisno od prednosti pridobljene lastnosti za naravno selekcijo in bremenom zaradi dodatnih/mutiranih metabolnih poti (Boto, 2010; Palaniswami, 2011). Pogostost uspešne izmenjave genov je odvisna od bližine bakterij, metabolne kompatibilnosti, prilagoditve na

njihovo abiotiko okolje, mehanizmov za izražanje genov in mehanizma prenosa genov (Palaniswami, 2011).

Posledica HPG je lahko tudi vnos škodljivih genov ter kopičenje odvečnih genov, zato imajo organizmi številne fizične, biokemijske in genetske ovire za omejevanje pogostosti vnosa genov. Na splošno možnost za HPG pada sorazmerno z genetsko razdaljo, zato je frekvenca HPG veliko večja znotraj vrste kot pa med manj sorodnimi vrstami (Keese, 2008). V globalni bakterijski populaciji HPG verjetno ni zelo pogost, razen v primeru seleksijskega pritiska za preneseno lastnost (Palaniswami, 2011).

Preglednica 1: Dejavniki, ki vplivajo na HPG (Keese, 2008)

	Relativna pogostost HPG		
	Nizka	Srednja	Visoka
Vrsta organizma	večcelični evkarionti	prokarionti/enocelični evkarionti	virusi
Genetski odnos med donorjem in prejemnikom gena	manj sorodne vrste	bolj sorodne vrste	iste vrste ali med sevi
Ekološki odnos med donorjem in prejemnikom gena	ločeni v prostoru ali času	parazitski/simbiotični	ista ekološka niša
Funkcija gena	toksična/informacijska	stukturarna/metabolna	povezana z mobilnimi genskimi elementi, patogenostjo, obrambo, prilagoditvijo na okolje/gostitelja

Gene, ki se prenašajo s HPG, lahko razdelimo v tri skupine: analogi (enaka funkcija, različen izvor), heterologi (različna funkcija in izvor) in homologi (isti izvor, ista ali različna funkcija). S HPG lahko prejemniki pridobijo:

- novi gen, ki ga ostali nimajo,
- paralog (nastane z duplikacijo gena) danega gena, ki se razlikuje od evolucijskega prednika,
- filogenetsko različni ortolog (pridobimo s speciacijo), ki mu sledi izpodrivanje s ksenolognim genom (dobimo s HPG) (Palaniswami, 2011).

Pomembnost HPG je bila prvič opažena, ko so odkrili, da je večkratna odpornost proti antibiotikom »nalezljivo dedna« med povzročitelji bolezni. Danes vemo, da je HPG izredno pomemben za bakterijsko evolucijo. HPG lahko, kot posledica sprememb v bakterijskih

genomih, povzroči velike spremembe v ekoloških in patogenih značilnostih vrste, ki so pomembne za raznolikost in speciacijo. Izmenjava genskega materiala je pomemben adaptiven mehanizem bakterij za povečanje genetske raznolikosti in povezovanje genov z različnim evolucijskim ozadjem. Nove ali rekombinirane genetske informacije omogočijo nove metabolne aktivnosti in posledično življenje v novih ekoloških nišah. Poleg tega pospešujejo hitro prilagajanje bakterijske populacije na močan selektiven pritisk, npr. na antibiotike, ki so uporabljeni v humani in veterinarski medicini ter živinoreji (Palaniswami, 2011; Keese, 2008).

Spemembe genomov, ki so posledica HPG, lahko ugotovimo s pomočjo novih fenotipskih lastnosti, na ravni DNA s primerjavo zaporedij nukleotidov, bodisi na ravni celih genomov ali le določenih odsekov, ki se razlikujejo pri različnih bakterijah po vsebnosti nukleotidov GC (Keese, 2008). Fenotipsko najbolj sledljive spremembe genomov so povezane z genskimi zapisi za odpornost proti antibiotikom (Zhang in sod., 2012; Martinez, 2008). V svojem prvotnem gostitelju so del integriranih regulatornih in metabolnih omrežij, vendar se lahko prenestijo na mobilne genetske elemente in po HPG v druge bakterije posredujejo fenotip, povezan s prvotnim genskim zapisom, ali celo spremenjen fenotip (Martinez, 2008). Genski zapisi iz nekonjugativnih plazmidov, kot je pUC19 ali pORF-hIL-12, se v druge bakterije lahko prenesejo s transformacijo.

#### 4.4.3.1.1 Vnos DNA v bakterije s transformacijo

Naravna transformacija je vnos proste bakterijske DNA iz okolja v naravno kompetentne bakterijske celice (Kümmerer, 2004; Thomas in Nielsen, 2005). Naravna kompetenca je genetsko programirano fiziološko stanje, pri katerem sodeluje več kot ducat proteinov in ki omogoči učinkovit vnos molekul DNA. Vnesena DNA je lahko vir hrani, matrica za popravilo DNA ali vir novih in/ali drugačnih genov, ki se lahko vključijo v bakterijski genom s homologno ali nehomologno rekombinacijo. Predpogoji za transformacijo so razpoložljivost proste DNA, razvoj kompetence celic in sprejem DNA ter možnost stabilne integracije ali samostojnega pomnoževanja vnesene DNA (Keese, 2008; Thomas in Nielsen, 2005).

Čeprav se domneva, da je naravna kompetenca razširjena med bakterijskimi vrstami, je dejanski delež bakterij, ki v naravnih okoljih lahko postanejo kompetentne, večinoma neznan (Keese, 2008; Thomas in Nielsen, 2005). Ugotavljanje tega deleža dodatno onemogoča

dejstvo, da bakterije, ki jih je možno gojiti, predstavljajo le manjši delež bakterij v okolju (Kümmerer, 2004). Raven HPG s transformacijo v okolju je s standardnimi tehnikami mikrobine genetike težko eksperimentalno meriti (Netherwood in sod., 1999). Čeprav je poznanih več kot 40 bakterijskih vrst, pri katerih je bila opisana naravna transformacija (Sun in sod., 2006), je mehanizem dobro opisan samo pri nekaterih: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus* in *Helicobacter pylori* (Dröge in sod., 1998; Thomas in Nielsen, 2005; Solomon in Grossman, 1996). V novejših študijah so preučili prenos genov v kompetentne celice sevov iz rodu *Rhizobium*, *Sinorhizobium* in *Mesorhizobium* (Broothaerts in sod., 2005). Naravna kompetenca za vnos genov je ugotovljena pri talnih mikroorganizmih (*Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ali *Streptomyces*), če pridejo v neposredni stik s prosto DNA (Dröge in sod., 1998).

Za bakterije vrste *E. coli* je dolgo veljalo, da niso naravno kompetentne in da je transformacija možna šele po predhodni obdelavi celic, kot je priprava umetno kompetentnih celic s spiranjem v raztopini hladnega kalcijevega klorida, ki ji sledi vnos DNA s topotnim šokom (Zhang in sod., 2012; Sun in sod., 2006). Novejše raziskave opisujejo, da je *E. coli* sposobna privzeti plazmidno DNA med kultivacijo na trdnem gojišču pri 37 °C brez dodatka Ca<sup>2+</sup> ali topotnega šoka (Sun in sod., 2006). Nadaljnja raziskava je pokazala, da je transformacija s plazmidno DNA na trdnem gojišču spodbujena z visoko koncentracijo agarja oziroma agaroze v gojišču. Zaključek teh študij je, da je *E. coli* sposobna spontanega vnosa plazmidne DNA med stacionarno fazo rasti (Zhang in sod., 2012).

#### 4.4.3.1.2 Zakaj je problematika HPG širši zdravstveni problem

S številnimi raziskavami so dokazali, da je povečana incidenca razvoja odpornosti pri patogenih, oportunističnih in komenzalnih bakterijah pri živalih verjetno posledica povečane uporabe antibiotikov v veterinarski medicini, kmetijstvu in ribogojništvu (Van den Bogaard in Stobberingh, 2000; Teuber, 2001). Molekularna analiza genov za odpornost proti antibiotikom je pokazala, da enake elemente vsebujejo bakterije pri živalih in ljudeh, kar je verjetno posledica HPG med bakterijami iz različnih ekoloških niš. Z določenimi živilskimi izdelki, vodo in neposrednim stikom se namreč lahko bakterije iz živali pogosto prenašajo na človeka in tudi obratno (Teuber, 2001). Geni z zapisom za odpornost proti antibiotikom se

kljub pomanjkanju selekcijskega pritiska le počasi izgubljajo iz mikrobiote (Levy in Marshall, 2004; Teuber, 2001).

Na podlagi prikazanih dejstev agenciji FDA in EMA priporočata uporabo vektorjev, ki se uporabljajo za vnos terapevtskih genov pri genski terapiji, brez genov z zapisom za odpornost proti antibiotikom ali pa uporabo vektorjev z zapisom za odpornost proti antibiotikom, ki se ne uporabljajo pogosto za zdravljenje humanih okužb. Trenutno tem zahtevam ustrezajo samo vektorji, ki imajo gen z zapisom za odpornost proti kanamicinu. Vektor pORF-hIL-12 ima genski zapis za odpornost proti ampicilinu. To je antibiotik iz skupine betalaktamov. Odpornost proti betalaktamom, predvsem tistim z razširjenim spektrom delovanja, pa v zadnjem desetletju uvrščamo med najpomembnejše dejavnike, ki pogosto onemogočajo učinkovito zdravljenje bakterijskih okužb.

#### 4.4.3.2 Možnost horizontalnega prenosa gena z zapisom za odpornost proti ampicilinu iz terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 v druge bakterije

Za gensko terapijo pasjih mastocitomov se uporablja komercialno dostopen terapevtski plazmid pORF-hIL12, ki je namenjen uporabi v raziskovalne namene (InvivoGen, Francija). Sestavni deli rekombinantnega plazmida so: pMB1 Ori (minimalno mesto začetka podvajanja *E. coli* z enako aktivnostjo, kot jo ima daljši Ori), SV40 pAn (signal za poliadenilacijo iz virusa SV40), EF-1a/HTLV (promotor za izražanje gena za hIL-12 v humanih celicah), gen za hIL12 (human IL-12), *amp* (gen z zapisom za odpornost proti ampicilinu) (pORF-hIL-12 G2, 2012).

Ker ima plazmid replikacijsko regijo pMB1, ga lahko namnožimo v sevu vrste *E. coli*, kjer je ta replikacijska regija aktivna. Če bi se plazmid prenesel v druge bakterijske vrste ali rodove, lahko ostane v klonski liniji le, če je replikacijska regija v novem gostitelju aktivna ali pa se plazmid oziroma deli plazmida z rekombinacijo vstavijo v kromosom. Replikacijske regije drugih bakterijskih vrst se od pMB1 razlikujejo v celotni dolžini regije, številu in razporeditvi zaporedja DnaA (zaporedja, dolga 9 bp, ki so specifična vezavna mesta za iniciatorski protein DnaA). Izvor teh razlik ni popolnoma znan, vendar se predvideva, da so posledica speciacije in selekcijskega pritiska (Mott in Berger, 2007).

Čeprav lahko plazmid pri aplikaciji genske terapije pride v kontakt z bakterijami vrste *E. coli* iz prebavnega in urinarnega trakta, je vnos v te načeloma naravno nekompetentne celice brez

elektroporacije malo verjeten (Dröge in sod., 1998; Thomas in Nielsen, 2005; Solomon in Grossman, 1996; Čemažar in sod., 2002). Plazmid je nekonjugativen, vsi geni, ki omogočajo mobilizacijo plazmida, pa so odstranjeni. Gen za odpornost proti ampicilinu in spremljajoča zaporedja pORF-hIL12 nimajo homolognih zaporedij, ki bi omogočala rekombinacijo odsekov plazmida v recipientski bakterijski celici. Gen z zapisom za odpornost ima lastni promotor, specifičen za *E. coli*, tako da se izraža samo v sevih vrste *E. coli* in nekaterih sorodnih vrstah. Zato je tudi tveganje za širjenje genskega zapisa za odpornost proti ampicilinu zelo majhno. Zaradi vsega tega se ne pričakuje širjenje plazmida v okolju po začetni sprostitvi, ampak se pričakuje hitro upadanje količine plazmida v okolju.

Za študijo uporabe elektrogenske terapije s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 je bila narejena ocena tveganja. Pri tem niso identificirali nevarnosti, ki bi lahko bile škodljive v primeru nenamernega sproščanja pORF-IL12 v okolje (Ocena tveganja za sproščanje GSO ..., 2009), poleg tega pa je bila tudi končna ocena strokovnega mnenja Znanstvenega odbora za namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje izdelkov na trg, da uporaba genske terapije z IL-12 ne predstavlja nevarnosti za človeka in okolje (plazmid pORF-IL12 ni sposoben povzročiti bolezni pri ljudeh, živalih in rastlinah in nima negativnih vplivov na okolje) (Strokovno mnenje - Intratumoralno injiciranje gole DNA ..., 2009).

## 5 MATERIALI IN METODE

### 5.1. MATERIALI

#### 5.1.1 Kemikalije

- Biolife, Italija
- gojišče BHI
  - gojišče Blood agar base N°2
  - kvasni ekstrakt
  - tripton (tryptic soy broth)
- BioRad, ZDA
- gojišče UriSelect™ 4
- Calbiochem, ZDA
- penicilin G
- Difco laboratories, ZDA
- gojišče Pannasy broth
- Fermentas, Kanada
- standardni lestvici fragmentov DNA: 1kb DNA Ladder (GeneRuler™), 1kb DNA Ladder (GeneRuler™) Plus
  - nanašalni pufer 6x DNA Loading Dye
  - raztopina PCR Master Mix
- Fluka ag, Švica
- lizocim
- Honeywell Riedel-de Haen®, Nemčija
- borova kislina
- InvivoGen, Francija
- plazmid pORF-hIL-12
- Kemika, Hrvaška
- glukoza
  - saharoza
  - manitol
- Merck, Nemčija
- kalijev fosfat trihidrat ( $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ )
  - EDTA
- Merck, Nemčija
- 96-odstotni etanol
  - glicin
  - kalijev hidrogen fosfat ( $K_2HPO_4$ )
  - mesni ekstrakt
  - magnezijev klorid ( $MgCl_2$ )
  - magnezijev klorid heksahidrat ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ )
  - magnezijev sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ )
- Policlinica s.r.l., Italija
- natrijev klorid (NaCl)
  - polietilen glikol (PEG 1000)
  - pepton iz mesa
  - pepton iz soje
- Roth, Nemčija
- agar
  - agarozna
  - borova kislina
  - kanamicin
  - gojišče SOB
  - Tris-Cl
  - Tris baza
- SIGMA Life Science, ZDA
- ampicilin
  - goveji serumski albumin

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| ➤ cefotaksim                      | ➤ sorbitol                              |
| ➤ etidijev bromid                 | Thermo Scientific, ZDA                  |
| ➤ gojišče LB (Luria-Broth medium) | ➤ raztopina »Dream <i>Taq</i> Green PCR |
| ➤ maleinska kislina               | Master Mix«                             |

### 5.1.2 Pribor in oprema

Za delo smo uporabili naslednji pribor in opremo:

- avtoklav – Kambič, Slovenija;
- avtomatske pipete – Eppendorf , Nemčija;
- centrifuga ROTANTA 460R – Hettich, Anglija;
- 50-mililitrske centrifugirke;
- cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl) – Biostea, Golias labortehnika, Slovenija;
- ciklični termostat BIORAD MyCycler™ thermal cycler – Biorad, ZDA;
- ciklični termostat GeneAmp PCR system 2400 – Perkin Elmer, ZDA;
- aparaturo Electrophoresis power supply consort (300 V - 500 mA) E835 – Consort, Belgija;
- kadičke za elektroforezo Hoefer™-HE33 (mini horizontal submarine unit) – Amersham Biosciences, Velika Britanija;
- elektroporacijske kivete 1 mm – Eppendorf, Nemčija;
- elektroporator 2510 – Eppendorf, Nemčija;
- filter za sterilizacijo CA-MEMBRANE 0,20µm – Sartorius AG, Nemčija;
- hladilnike (4 °C) in zamrzovalnike (-20 °C in -75 °C);
- kivete
  - 1,5 ml PS – Brand, Nemčija;
  - ratiolab®, Nemčija;
- kuhalo CL4 TRONIC®;
- laboratorijsko steklovino - erlenmajerice, merilni valji, čaše;
- laboratorijske rokavice za enkratno uporabo;
- magnetno mešalo IKA® RCT Standard – IKA, Kitajska;
- mikrocentrifugirke – Eppendorf, Nemčija;
- mikrocentrifugirke za PCR – Perkin Elmer, ZDA;
- mikrovalovno pečico – Gorenje, Slovenija;

- »nadzornik« pipetiranja BIOHIT MidiPlus – Sartorius Biohit, Finska;
- namizno centrifugo Eppendorf 29571 MiniSpin Plus – Eppendorf, Nemčija;
- namizno centrifugo Eppendorf 5417C – Eppendorf, Nemčija;
- nastavke z različnim volumnom za avtomatske pipete
  - 100 µL SafeSeal-Tips<sup>®</sup> – Biozym Diagnostik GmbH, Nemčija;
  - Biosfere filter tips – SARSTEDT, Nemčija;
- nosilce za vlivanje agaroznega gela in glavnike za jamice;
- plastične petrijevke – Biostea, Golias labortehnika, Slovenija;
- plinski gorilnik – Tlos, Hrvaška;
- stresalnik Platform shaker innova<sup>TM</sup> 2300 – New brunswick scientific, ZDA;
- tehtnico – KernPFB, Nemčija;
- termostatsko komoro (30 °C) – Sutjeska, Srbija;
- transiluminator BIOView UV light UXDT-20ML-15R – Biostep, Nemčija;
- transiluminator UVItec Limited 230V – 50/60 Hz UV radiation – St John's innovation centre, Anglija;
- spektrofotometer UV/VIS (Lambda Bio) – Perkin Elmer, ZDA;
- vibracijski mešalnik (EV-100 in Vibromix10) – Tehnica Železniki, Slovenija;
- vodne kopeli
  - ISOTEMP 215 – Fisher Scientific, ZDA;
  - Hibridization water bath STOVALL – Life Science INC., ZDA;
  - Memmert, Nemčija.

### 5.1.3 Klinični izolati in laboratorijski sevi

Brise kože psov, ki so prejeli elektrogensko terapijo z IL-12, odvzete neposredno pred terapijo in dva ter sedem dni po terapiji, smo pridobili na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Podatki o psih in vrsti tumorja so zbrani v preglednici 2.

Preglednica 2: Podatki o zdravljenih psih

OZNAKA	PODATKI O PACIENTU	TUMOR
A	gladkodlaki prinašalec	hemangiopericitom (recidiv)
B	bokser	mastocitom
C	bokser	mastocitom (recidiv)
D	bokser	liposarkom
E	mešanka	mastocitom
F	bernski planinski pes	mastocitom

Poleg kliničnih izolatov smo pri transformacijah uporabili tudi naslednje laboratorijske seve: *E. coli* MG1655, *E. coli* MG1655 *rec*<sup>-</sup>, *E. coli* DH5 $\alpha$  in *Klebsiella* EXB-S17.

#### 5.1.4 Gojišča

Vsa tekoča gojišča smo pripravili tako, da smo stehitali vse potrebne sestavine in dolili ustrezeno količino destilirane vode ter vse skupaj premešali na magnetnem mešalu. Vsa gojišča smo sterilizirali s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara. Raztopine sladkorjev in aminokislin smo sterilizirali s filtracijo skozi filtre z velikostjo por 0,22 µm. Pri pripravi trdnih gojišč smo, poleg standardnih sestavin za posamezno gojišče, pred avtoklaviranjem dodali 15 g/l agarja. Po avtoklaviranju smo gojišča ohladili v vodni kopeli na 55 °C in razlili v petrijevke. Uporabljali smo tudi trdna gojišča z dodatkom antibiotika. Osnovno gojišče smo pripravili enako, kot je opisano zgoraj. Ko je bilo gojišče ohlajeno na 55 °C, smo dodali ustrezeno količino založne raztopine antibiotika. Koncentracije založnih raztopin in končne koncentracije antibiotikov v gojišču so navedene v preglednici 3. Sestava vseh uporabljenih gojišč je prikazana v preglednici 4. Gojišča smo do uporabe hranili v hladni sobi (4 °C).

Preglednica 3: Založne in končne koncentracije uporabljenih antibiotikov

ANTIBIOTIKI	Založna koncentracija (mg/ml)	Končna koncentracija (µg/ml)
ampicilin	100	110
kanamicin	30	5
cefotaksim	10	2

Preglednica 4: Sestava uporabljenih gojišč

GOJIŠČE	SESTAVINA	Volumen (ml), masa (g) ali končna koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	VIR
<b>TEKOČE GOJIŠČE LB</b>	gojišče LB NaCl dH <sub>2</sub> O	20g/l 5 g/l	SIGMA Life Science
<b>TEKOČE GOJIŠČE LB z 1,5-odstotnim glicinom</b>	gojišče LB 2,5 M glicin*	92,2 ml 7,9 ml	Matsumura in sod., 2011
<b>GOJIŠČE LB z 0,5 M sorbitolom</b>	gojišče 2x LB 1 M sorbitol*	50 ml 50 ml	Zhang in sod., 2010; Xue in sod., 1999
<b>TEKOČE GOJIŠČE LB z 0,5 M sorbitolom in 0,38 M manitolom</b>	gojišče 2x LB 2 M sorbitol* 1 M manitol* dH <sub>2</sub> O	50 ml 25 ml 6,92 g 25 ml	Xue in sod., 1999
<b>TEKOČE GOJIŠČE BHI</b>	gojišče BHI dH <sub>2</sub> O	37 g/l	Biolife
<b>GOJIŠČE KRVNI AGAR</b>	gojišče Blood agar base N°2 dH <sub>2</sub> O goveja kri	40 g/l 50 ml/l	Biolife
<b>TEKOČE GOJIŠČE SOC</b>	gojišče SOB dH <sub>2</sub> O 40-odstotna glukoza*	30,7 g/l 9,1 ml/l	Matsumura in sod., 2011
<b>GOJIŠČE SOB</b>	gojišče SOB dH <sub>2</sub> O agar	30,7 g/l 15 g/l	Matsumura in sod., 2011
<b>TEKOČE GOJIŠČE SMM (pH 6,5) (5,5 delov)</b>	BSA (0,5 delov) saharoz maleinska kislina MgCl <sub>2</sub> dH <sub>2</sub> O	10% 1 M 0,04 M 0,04 M	Augustin in Götz, 1990
<b>TEKOČE GOJIŠČE BM</b>	Pannasy broth (4 deli)	17,5 g/l	
	pepton kvasni ekstrakt glukoza NaCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O	1% 0,5 % 0,1% 0,5% 0,1%	Augustin in Götz, 1990
<b>TEKOČE GOJIŠČE BHI z 0,4-odstotno glukozo</b>	gojišče BHI 40% glukoza*	100 ml 1 ml	Sekizaki in sod., 1998
<b>TEKOČE GOJIŠČE BHI + 20 mM MgCl<sub>2</sub></b>	BHI MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O	37 g/l 203,30 g/mol/l	Sekizaki in sod., 1998
<b>GOJIŠČE BHI + 30-odstotni ekstrakt konjskega mesa</b>	gojišče BHI ekstrakt konjskega mesa agar dH <sub>2</sub> O	37 g/l 30% 15 g/l	Sekizaki in sod., 1998
<b>TEKOČE GOJIŠČE CRM</b>	glukoza saharoz MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O pepton iz soje kvasni ekstrakt dH <sub>2</sub> O	10 g/l 103 g/l 10,12 g/l 15 g/l 5 g/l	Pigac in Schrempf, 1995

se nadaljuje

nadaljevanje

GOJIŠČE	SESTAVINA	Volumen (ml), masa (g) ali končna koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	VIR
GOJIŠČE TSBP	BHI	37 g/l	Pigac in Schrempf, 1995
	pepton iz soje	5 g/l	
	agar	15 g/l	
	dH <sub>2</sub> O		
GOJIŠČE Uri-Select <sup>TM</sup> 4	gojišče Uri-Select <sup>TM</sup> 4	56,8 g	Bio-Rad

Legenda:

BHI - gojišče Brain heart infusion broth; BM - gojišče Basic medium; BSA - goveji serumski albumin; SOB - gojišče Super optimal broth; TSBP - gojišče Tryptic soy broth; \*- dodamo tik pred uporabo

Pri pripravi gojišča SMMP50 smo Pannasy-juho avtoklavirali, BSA in SMM pa smo pripravili posebej in sterilizirali s filtracijo (Augustin in Götz, 1990).

### 5.1.5 Pufri, raztopine in reagenti

Pufre smo pripravljali tako, da smo najprej stehtali vse potrebne sestavine, jih raztoplili v destilirani vodi in umerili pH. Ko so bile vse sestavine raztopljene, smo dolili destilirano vodo do končnega volumna.

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabljali pufer 1xTBE. Za pripravo založne raztopine pufra 5xTBE smo v 800 ml destilirane vode dodali 54 g Tris-baze, 27,5 g borove kisline in 20 ml 0,5 M (pH 8) EDTA in dopolnili volumen pufra z destilirano vodo do 1 litra. 0,5 M EDTA s pH 8 smo pripravili tako, da smo 93,6 mg EDTA raztoplili v 500 ml vode in umerili pH z 10 mM NaOH.

Sestavine in njihove količine za pripravo vseh uporabljenih pufrov in raztopin so navedene v preglednici 5.

Preglednica 5: Uporabljeni pufri, raztopine in reagenti

PUFER, RAZTOPINA	SESTAVINA	Volumen (ml), masa (g) ali končna koncentracija ( $\mu$ g/ml)	VIR
<b>5X TBE (1 liter)</b>	Tris-baza borova kislina EDTA	54 g 27,5 g 20 ml 0,5 M (pH 8)	Molecular Cloning..., 2001
<b>10-odstotni glicerol (100 ml)</b>	100-odstotni glicerol dH <sub>2</sub> O	10 g 90 ml	Policlinica s.r.l.
<b>15-odstotni glicerol (100 ml)</b>	100-odstotni glicerol dH <sub>2</sub> O	15 g 85 ml	Policlinica s.r.l.
<b>10-odstotna raztopina glicerola z 0,5 M sorbitolom (20 ml)</b>	100-odstotni glicerol 1 M sorbitol dH <sub>2</sub> O	2 g 1,82 g do 20 ml	Zhang in sod., 2010
<b>10-odstotni glicerol z 0,5 M sorbitolom in 0,5 M manitolom</b>	15-odstotni glicerol 3 M sorbitol 1 M manitol dH <sub>2</sub> O	100 ml 25 ml 13,66 g 25 ml	Xue in sod., 1999
<b>15-odstotni glicerol z lizocimom</b>	15-odstotni glicerol lizocim	100 $\mu$ g/ml	Pigac in Schrempf, 1995
<b>30-odstotni PEG 1000, 10- odstotni glicerol in 6,5- odstotna saharoza v destilirani vodi (5 ml)</b>	PEG 1000 10-odstotni glicerol saharoza dH <sub>2</sub> O	1,5 g 1 g 0,325 g do 5 ml	Pigac in Schrempf, 1995
<b>elektroporacijski pufer EB (200 ml)</b>	2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O (pH 8,37) 10-odstotna saharoza dH <sub>2</sub> O	2 ml 20 g do 200 ml	Sekizaki in sod., 1998
<b>EB z 15-odstotnim glicerolom (10 ml)</b>	2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O (pH 8,37) 10-odstotna saharoza 15-odstotni glicerol dH <sub>2</sub> O	0,1 ml 1 g 1,5 g do 10 ml	Sekizaki in sod., 1998
<b>pufer za zmrzovanje (100 ml)</b>	65-odstotni glicerol 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 0,025 M TrisCl (pH 8,0) dH <sub>2</sub> O	65 g 2,465 g 5 ml do 100 ml	Ausubel, 1992
<b>10-odstotna saharoza (150 ml)</b>	saharoza dH <sub>2</sub> O	15 g do 150 ml	
<b>1 M sorbitol (100 ml)</b>	1 M sorbitol dH <sub>2</sub> O	18,22 g 100 ml	
<b>0,5 M saharoza (100 ml)</b>	1 M saharoza dH <sub>2</sub> O	17,115 g do 100 ml	
<b>penicilin G</b>		30 $\mu$ g/ml	

10-odstotni in 15-odstotni glicerol smo sterilizirali z avtoklaviranjem, medtem ko smo raztopino 30-odstotnega PEG 1000, 10-odstotnega glicerola in 6,5-odstotne saharoze v destilirani vodi ter elektroporacijski pufer EB in EB z 15-odstotnim glicerolom sterilizirali s filtracijo.

### 5.1.6 Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide je izdelalo podjetje Sigma, ZDA. V spodnjih preglednicah so navedeni zaporedja začetnih oligonukleotidov in velikost PCR-pomnožka.

Preglednica 6. Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za 16S rRNA

TIP	OZNAKA	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5'-3'	VELIKOST POMNOŽKA	VIR
F	fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	~ 1500 bp	Weisburg in sod., 1991
R	1392	ACGGGCGGTGTGTAC		Lane in sod., 1985
F	27	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 1500 bp	Bianciotto in sod., 1996
R	1495	CTACGGCTACCTTGTACGA		Bianciotto in sod., 1996

Preglednica 7. Začetni oligonukleotidi za preverjanje prisotnosti specifičnega odseka terapevtskega plazmida pORF-hIL-12

OZNAKA	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5'-3'	VELIKOST POMNOŽKA	VIR
F1	CGAGGTCCCTCCAAACCGTTGTCA		
R	CGTATCGTAGTTATCTACACGAC	1421 bp	to delo

Preglednica 8. Začetni oligonukleotidi NDM za preverjanje prisotnosti plazmida ABA NKA (Matjašič, 2012)

OZNAKA	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5'-3'	VELIKOST POMNOŽKA	VIR
F1	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT		Woodford, neobjavljeno, cit.
R	GTAGTGCTCAGTGTGGCAT	475 bp	po Matjašič, 2012

### 5.1.7 Kompleti

- DNeasy® Blood Tissue Kit (50) Cat. No. 69504 – Qiagen GmbH, Nemčija;
- EndoFree® Plasmid Maxi, Mega, Giga Kits (For purification of advanced transfection grade plasmid DNA) – Qiagen GmbH, Nemčija;
- Gene JET™ Gel Extraction Kit – Fermentas LIFE Sciences, Kanada;
- Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit – Fermentas LIFE Sciences, Kanada.

## 5.2 METODE

### 5.2.1 Izolacija plazmida pORF-hIL-12

Plazmid pORF-hIL-12 (InvivoGen, Francija) smo izolirali iz bakterije *E. coli* GT110 s pomočjo kompleta EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi, Mega, Giga Kits po navodilih proizvajalca. Končna koncentracija izoliranega plazmida je bila 1,2 µg/µL. Do uporabe smo ga shranili v zamrzovalnik (-20 °C). Nukleotidno zaporedje in slika plazmida pORF-hIL-12 so v prilogi A.

### 5.2.2 Odvzem brisov kože

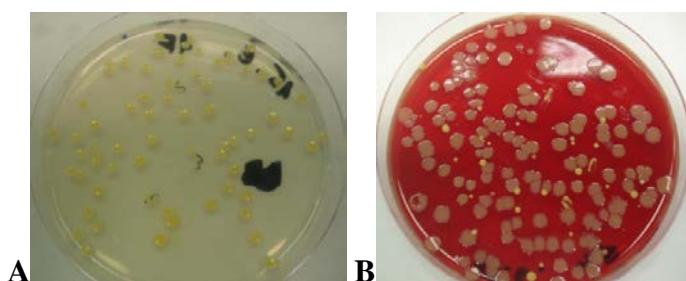
Brise kože smo odvzeli pri pasjih pacientih na mestu in v okolini aplikacije genske terapije, in sicer neposredno pred terapijo in dva ter sedem dni po terapiji (slika 1.). V nalogu smo vključili vse pse z rakom, ki so prišli na zdravljenje na Kliniko za kirurgijo in male živali veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v obdobju med 1. 12. 2011 in 30. 7. 2012.



Slika 1: Prikaz tumorja in mesta odvzema brisov. Tumor in mesto odvzema brisa pred terapijo (A), dva dni po terapiji (B) in sedem dni po terapiji (C).

### 5.2.3 Izolacija čistih kultur in ugotavljanje rasti posameznih kultur pri različnih temperaturah in na gojišču LB z dodanim ampicilinom

Brise, ki smo jih odvzeli pred terapijo, smo nacepili na gojišče LB in na krvni agar. Plošče smo inkubirali pri sobni temperaturi dva do tri dni (slika 2). Posamezne morfološko različne kolonije smo večkrat zaporedno precepili na novo gojišče, tako da smo dobili čiste kulture, ki smo jih uporabili pri nadalnjem delu. Čiste kulture smo precepili na nove plošče z gojiščem LB in LB z dodanim ampicilinom, ki smo jih inkubirali na 30 °C in 37 °C.



Slika 2: Rast bakterij, odvzetih iz kože pasjih pacientov. Rast na gojišču LB (A) in na krvnem agarju (B).

Brise, ki smo jih odvzeli dva in sedem dni po terapiji, smo nacepili na gojišče LB in LB z dodanim ampicilinom. Plošče smo inkubirali pri sobni temperaturi in večkrat precepljali, tako da smo na koncu dobili čiste kulture, ki smo jih uporabili za nadaljnje delo.

#### **5.2.4 Shranjevanje kultur**

Vse bakterijske seve, iz katerih smo pripravili lizate in jih kasneje opredelili na osnovi zaporedja za 16S rRNA, smo shranili pri -80 °C.

#### **5.2.5 PCR**

##### **5.2.5.1 Priprava bakterijskih lizatov**

Lizate posameznih bakterijskih izolatov smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 200 µL sterilne destilirane vode in dodali dve polni cepilni zanki bakterijske kulture. Bakterije smo resuspendirali na vibracijskem mešalniku ter jih nato segrevali 10 minut v vreli vodi. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 14.000 vrt./minuto pri sobni temperaturi. Po končanem centrifugiranju smo prenesli 150 µL supernatanta v novo mikrocentrifugirko. Tako pripravljene bakterijske lizate smo shranili v zamrzovalniku (-20 °C).

##### **5.2.5.2 Začetni oligonukleotidi za PCR**

Bakterijske izolate smo uvrstili v posamezne rodove na podlagi zaporedja gena za 16S rRNA. Gen za 16S rRNA smo namnožili iz celokupne genomske DNA v bakterijskih lizatih po programu, ki je naveden v preglednici 9. Za reakcijo smo uporabili univerzalne bakterijske začetne oligonukleotide, ki so navedeni v preglednici 6.

Prisotnost odsekov terapevtskega plazmida pri bakterijah, ki smo jih izolirali dva in sedem dni po elektrogenski terapiji, smo preverili z reakcijo PCR. Odsek smo pomnožili po programu, ki je naveden v preglednici 10, pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida, ki sta navedena v preglednici 7.

### 5.2.5.3 Sestava reakcijske mešanice za PCR

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje gena za 16S rRNA smo pripravili po naslednjem protokolu:

- po 2 µl vsakega od začetnih oligonuklotidov fd1 in 1392;
- 25 µl raztopine »Dream Taq Green PCR Master Mix ali PCR Master Mix«;
- 17 µl sterilne destilirane vode in
- 4 µl bakterijskega lizata.

Skupen volumen posamezne reakcijske mešanice je bil 50 µl.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje specifičnega odseka terapevtskega plazmida smo pripravili po naslednjem protokolu:

- po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov M\_A-F1 in M\_A-R;
- 12,5 µl raztopine »Dream Taq Green PCR Master Mix ali PCR Master Mix«;
- 5,5 µl sterilne destilirane vode in
- 5 µl bakterijskega lizata.

Skupen volumen posamezne reakcijske mešanice je bil 25 µl.

Za vsak niz reakcij smo pripravili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Pri obeh kontrolah je bila reakcijska mešanica sestavljena podobno, le da smo namesto bakterijskega lizata v negativno kontrolo dodali 5 µl sterilne destilirane vode, v pozitivno kontrolo pa 4 µl sterilne destilirane vode in 1 µl 10x razredčene izolirane DNA (0,12 µg/µL) terapevtskega plazmida pORF-hIL-12.

### 5.2.5.4 Razmere za pomnoževanje s PCR

Razmere, pri katerih smo izvajali reakcije PCR, so navedene v preglednicah 9 in 10.

Preglednica 9: Program za pomnoževanje gena za 16S rRNA.

	TEMPERATURA	TRAJANJE	ŠTEVilo CIKLOV
1. ZAČETNA DENATURACIJA	95 °C	5 minut	1x
DENATURACIJA	94 °C	30 sekund	
2. PRILEGANJE ZAČETNIH OLIGONUKLOTIDOV	60 °C/55 °C/50 °C*	30 sekund	30x
DOGRAJEVANJE VERIGE	72 °C	2 minuti	
3. KONČNO DOGRAJEVANJE VERIGE	72 °C	7 minut	1x

Legenda:

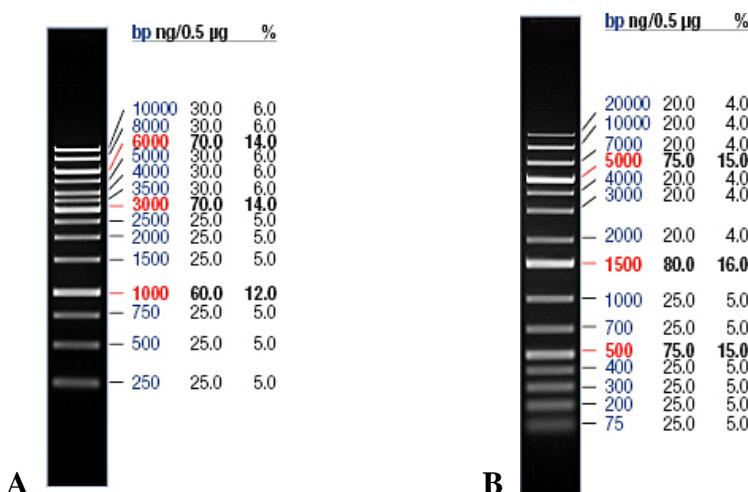
\*- za posamezne izolate smo optimizirali temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov

Preglednica 10: Program za pomnoževanje specifičnega odseka terapevtskega plazmida

		TEMPERATURA	TRAJANJE	ŠTEVilo CIKLOV
1.	ZAČETNA DENATURACIJA DENATURACIJA	95 °C 94 °C	5 minut 30 sekund	1x
2.	PRILEGANJE ZAČETNIH OLIGONUKLOTIDOV	60 °C	30 sekund	30x
	DOGRAJEVANJE VERIGE	72 °C	2 minuti	
3.	KONČNO DOGRAJEVANJE VERIGE	72 °C	7 minut	1x

### 5.2.6 Agarozna gelska elektroforeza

Prisotnost in velikost fragmentov DNA smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Glede na pričakovano velikost fragmentov DNA smo pripravili 0,9- ali 1,3-odstotne gele. V erlenmajerico smo zatehtali ustrezeno količino agaroze in dolili pufer 1xTBE. Nato smo suspenzijo segrevali v mikrovalovni pečici toliko časa, da se je agaroza popolnoma raztopila. Gel smo ohladili in dodali etidijev bromid (iz založne raztopine 10 mg/ml) do končne koncentracije 0,5 µgr/ml gela ter ga vlili v pripravljen nosilec z vstavljenim glavnikom za jamice in počakali, da se strdi. Nato smo iz gela odstranili glavnik za jamice in ga na nosilcu vstavili v elektroforezno kadičko ter prelili s puferjem 1xTBE. V prvo in zadnjo jamico smo vnesli ustrezeno standardno lestvico fragmentov DNA, v ostale jamice pa posamezne PCR-pomnožke. Za elektroforezo smo uporabili standardni lestvici fragmentov DNA »1kb DNA Ladder (GeneRuler™)« ali »1kb DNA Ladder (GeneRuler™) Plus«. Velikost fragmentov po elektroforezi je razvidna iz slike 3. Če smo za reakcijo PCR uporabili raztopino »Dream Taq Green PCR Master Mix«, smo vnesli v jamico PCR-pomnožek, medtem ko smo po uporabi raztopine »PCR Master Mix« vsakemu vzorcu pred vnosom dodali nanašalni pufer 6xDNA »Loading Dye«. Vse elektroforeze so bile narejene pri napetosti 10V/cm gel.



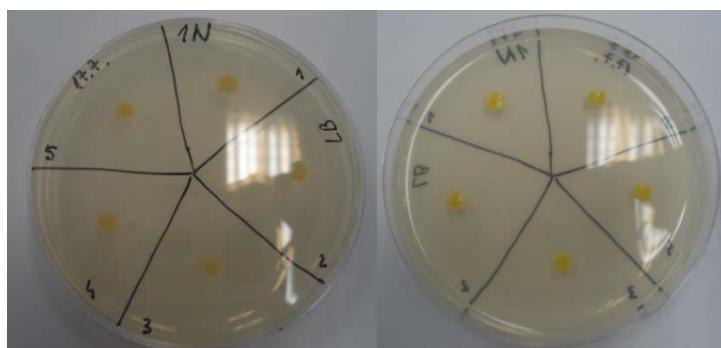
Slika 3: Standardni lestvici fragmentov DNA, ki smo jih uporabili pri agarozni gelski elektroforezi – 1 kb DNA Ladder (A) in 1 kb DNA Ladder Plus (B)

### **5.2.7 Izolacija in čiščenje PCR-pomnožka iz gela ter sekvenciranje in analiza dobljenega nukleotidnega zaporedja**

PCR-pomnožke ustrezne velikosti smo po končani elektroforezi izrezali s sterilnim skalpelom iz agaroznega gela in jih očistili s kompletom Gene JET<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca. Očiščene pomnožke smo poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen Evropa. Dobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali s pomočjo programa Classifier na spletni strani Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

### **5.2.8 Poskus vnosa terapevtskega plazmida v neobdelane bakterijske celice ter preverjanje zadrževanja plazmidne DNA na površini bakterijskih celic**

Vsako LB ploščo smo navidezno razdelili na pet delov (slika 4). Po eno kolonijo vsakega testiranega seva smo nacepili točkovno na vsakega izmed petih delov plošče. Med dva- do tridnevno inkubacijo pri sobni temperaturi smo v različnih časovnih intervalih odpipetirali na posamezno kolonijo 1 µl 10x razredčenega terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 (0,12 µg/µL). Peta kolonija na vsaki plošči je bila kontrolna, zato k tej nismo dodali DNA pORF-hIL-12. Polovico vsake od petih kolonij iz posamezne plošče smo prenesli v sterilne mikrocentrifugirke ter celice resuspendirali v fiziološki raztopini. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje v namizni centrifugi pri 14.000 vrt./minuto in sobni temperaturi. Nato smo odpipetirali supernatant in ponovili postopek spiranja celic z fiziološko raztopino še dvakrat. Zatem smo odpipetirali supernatant in bakterijske celice resuspendirali v 200 µl sterilne destilirane vode ter pripravili bakterijski lizat, kot je bilo opisano v razdelku 5.2.5.1. Z reakcijo PCR smo preverili prisotnost odseka terapevtskega plazmida v vsakem lizatu. Če smo dobili ustrezen PCR-pomnožek, smo povečali število spiranj bakterijskih celic v sterilni fiziološki raztopini ter nato pripravili bakterijski lizat. Postopek smo ponavljali, dokler po spiranju, kljub celicam v usedlini, nismo po elektroforezi več zaznali za terapevtski plazmid značilnega PCR-pomnožka.



Slika 4: Dodajanje terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 k neobdelanim kolonijam testiranih bakterij

Nedavno so Zhang in sodelavci objavili, da jim je brez predhodne obdelave bakterijskih celic ter »umetne« tvorbe por z električnimi pulzi oziroma temperaturnim šokom uspelo v sicer naravno nekompetentno vrsto *E. coli* vnesti plazmidno DNA (Zhang in sod., 2012). Zato smo v diplomskem delu poskusili vnesti plazmid pORF-hIL-12 v različne seve bakterije rodu *Escherichia* po postopku iz članka Zhang in sod. Uporabili smo sev iz površine kože psa 7FA ter laboratorijske seve DH5 $\alpha$ , HB101 in CSH100. Seve smo nacepili na trdno gojišče LB in plošče nato inkubirali prek noči pri 37 °C. Nato smo štiri polne cepilne zanke kulture razredčili v 100 ml tekočega gojišča 1,5x LB in inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 30 °C. Ko je bila optična gostota kulture pri OD<sub>600</sub> ~ 1,5, smo odpipetirali 500 µl kulture in jo centrifugirali 4 minute pri 13.400 vrt./minuto. Iz mikrocentrifugirke smo nato odpipetirali 450 µl supernatanta, v preostalih 50 µl pa resuspendirali usedlino bakterijskih celic. K celicam smo dodali 1,25 µl desetkrat razredčene DNA pORF-hIL-12 (0,12 µg/µL). Vsebino mikrocentrifugirke smo odpipetirali na ploščo z gojiščem LB s 5-odstotnim agarjem in dodanim ampicilinom (110 µg/ml) ter jo razmazali s sterilnimi steklenimi kroglicami.

### **5.2.9 *In vitro* transformacija DNA pORF-hIL-12 z elektroporacijo v izbrane seve, izolirane iz površine kože psov**

#### **5.2.9.1 Transformacija sevov iz rodu *Staphylococcus***

Bakterije rodu *Staphylococcus* smo transformirali po dveh različnih protokolih.

##### **5.2.9.1.1 Priprava elektrokompetentnih celic in elektroporacija po metodi, ki je bila opisana v članku avtorjev Augustina in Götza (1990)**

V 10 ml tekočega gojišča LB smo vcepili polno ezo kulture iz trdnega gojišča LB. Kulturo smo inkubirali prek noči na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo razredčili 1 ml prekonočne kulture v 50 ml tekočega gojišča BM in ponovno inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 37 °C. Ko je optična gostota kulture pri OD<sub>578</sub> dosegla vrednost 0,5–0,65, smo 40 ml kulture odlili v 50-mililitrsko centrifugirko. Nato smo kulturo 20 minut centrifugirali pri 5000x g in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celice sprali štirikrat v 10-odstotni raztopini glicerola. Prvič smo celice resuspendirali v 40 ml raztopine 10-odstotnega glicerola. Temu je sledilo centrifugiranje pri enakih razmerah kot prej. Pri drugem spiranju smo dodali 20 ml, pri tretjem 1 ml in pri četrtem spiranju 20 µl 10-odstotne hladne raztopine glicerola. Po končanih

spiranjih smo usedlini bakterij dodali 180 µl 10-odstotnega glicerola, tako da je bila končna koncentracija bakterijskih celic  $1\text{-}5 \times 10^{10}$  celic/ml. Kompetentne celice smo do uporabe shranili pri -80 °C.

Elektroporacijo celic smo naredili tako, da smo k 50 µl kompetentnih celic dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µL). Transformacijsko mešanico smo premešali s konico nastavka za avtomatsko pipeto in jo nato inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo jo odpipetirali v predhodno ohlajeno kiveto, ki smo jo vstavili v elektroporator (Eppendorf, Nemčija), kjer smo celice izpostavili električnemu pulzu (1800 V). Po elektroporaciji smo takoj dodali 1 ml gojišča SMMP50 in inkubirali s stresanjem 90 minut pri 37 °C. Nato smo različne alikvote kulture razmazali na trdna gojišča BM (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl) ter na gojišče BM z dodanim ampicilinom (100 µl in 150 µl). Vse nacepljene plošče smo inkubirali 20 ur pri 37 °C.

#### 5.2.9.1.2 Priprava elektrokompetentnih celic in elektroporacija celic po internem laboratorijskem protokolu Charpentier Emmanuelle

1 ml prekonočne kulture smo razredčili v 100 ml svežega tekočega gojišča LB in inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 37 °C, dokler OD<sub>650</sub> ni dosegla vrednosti 0,3–0,6. Nato smo kulturo odlili v 50-mililitrsko centrifugirko. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 4500 vrt./minuto in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant. Celice smo sprali dvakrat v 0,5 M ledeno hladni saharozi, in sicer tako, da smo pri prvem spiranju dodali enak volumen ledeno hladne saharoze, pri drugem spiranju pa polovični volumen. Na koncu smo dodali 0,1 volumna 0,5 M ledeno hladne saharoze in naredili alikvote po 100 µl ter jih zamrznili pri -80 °C.

Elektroporacijo celic smo naredili tako, da smo dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µL) k 40 µl kompetentnih celic, transformacijsko mešanico premešali s konico nastavka za avtomatsko pipeto in jo nato inkubirali 1 minuto na ledu. Mešanico smo odpipetirali v predhodno ohlajeno kiveto, ki smo jo vstavili v elektroporator (Eppendorf, Nemčija), kjer smo celice izpostavili električnemu pulzu (2500 V). Po elektroporaciji smo takoj dodali 300 µl gojišča LB in inkubirali 90 minut na rotacijskem stresalniku pri 37 °C. Nato smo različne alikvote kulture razmazali na gojišča LB (15 µl, 25 µl, 50 µl) ter na gojišča LB z dodanim ampicilinom (50 µl in 100 µl). Vse plošče smo inkubirali prek noči pri 37 °C.

Kot kontrolo smo uporabili plazmid pUB110, ki smo ga izolirali iz bakterije *Bacillus subtilis* s pomočjo kompleta DNeasy® Blood Tissue Kit (50) po navodilih proizvajalca. K 40 µl kompetentnih celic smo dodali 10 µl kontrolnega plazmida in naredili elektroporacijo po enakem postopku kot s plazmidno DNA pORF-hIL-12. Po 100 µl in 150 µl transformiranih celic smo razmazali na plošče z gojiščem LB z dodanim kanamicinom ter inkubirali prek noči pri 37 °C.

#### 5.2.9.2 Transformacija sevov iz rodu *Bacillus*

Transformacijo bakterij rodu *Bacillus* smo naredili po protokolu Xue in sod. (1999). Elektrokompetentne celice smo pripravili tako, da smo prekonočno kulturo 16-krat razredčili v 100 ml svežega tekočega gojišča LB z 0,5 M sorbitolom in kulturo inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 37 °C, dokler OD<sub>600</sub> ni dosegla vrednosti 0,85–0,95. Nato smo celice ohladili, tako da smo centrifugirko za 10 minut potopili v ledeno mrzlo vodo. Od ohlajanja smo pazili, da so bile centrifugirke s celicami vedno v ledno mrzli kopeli. Kulturo smo odlili v 50-mililitrsko centrifugirko in jo pet minut centrifugirali pri 5000x g in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant. Celice smo sprali štirikrat v ledeno hladni elektroporacijski raztopini (0,5 M sorbitol, 0,5 M manitol, 10-odstotni glicerol), in sicer tako, da smo pri prvem spiranju dodali ½ volumen raztopine, pri nadaljnjih spiranjih pa po 10 ml, 5 ml in 2,5 ml ledeno hladne elektroporacijske raztopine. Po končanem spiranju smo celice resuspendirali v elektroporacijski raztopini, in sicer v 1/40 volumna izhodiščne kulture, tako da smo dobili koncentracijo celic 1-1,3 x 10<sup>10</sup> cfu/ml. Kompetentne celice smo do uporabe shranili pri -80 °C.

Za elektroporacijo smo k 60 µl kompetentnih celic dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µL). Mešanico smo odpipetirali v predhodno ohlajeno kiveto in inkubirali 1 minuto. Napetost, ki smo jo uporabili za elektroporacijo, je bila 2100-voltna. Po elektroporaciji smo takoj dodali 1 ml gojišča (LB z 0,5 M sorbitolom in 0,38 M manitolom) in inkubirali tri ure pri 37 °C. Nato smo različne alikvote kulture razmazali na trdna gojišča LB (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl) ter na gojišče LB z dodanim ampicilinom (100 µl in 150 µl). Vse plošče smo inkubirali prek noči pri 37 °C.

Kot kontrolo smo uporabili plazmid pED302, ki se po transformaciji rekombinira v kromosom sevov iz rodu *Bacillus* in ima zapis za odpornost proti kanamicinu (Tortosa in sod., 2001). Plazmid smo izolirali iz bakterije *E. coli* s pomočjo Gene JET™ Plasmid

Miniprep Kit po navodilih proizvajalca. K 60 µl kompetentnih celic smo dodali 5 µl kontrolnega plazmida in naredili elektroporacijo po enakem postopku kot s plazmidno DNA pORF-hIL-12. Po 100 µl in 150 µl transformiranih celic smo razmazali na gojišča LB z dodanim kanamicinom. Plošče smo inkubirali prek noči pri 37 °C.

#### 5.2.9.3 Transformacija sevov iz rodu *Acinetobacter*, *Escherichia* (MG 1655, MG 1655 rec<sup>-</sup>, DH5 $\alpha$ ) in *Klebsiella* (EXB-S17)

V 100 ml svežega tekočega gojišča LB smo razredčili 0,5 ml prekonočne kulture in inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 37 °C, dokler OD<sub>600</sub> ni dosegla vrednosti 0,5–0,6. Nato smo celice ohladili na ledu (15 minut). Kulturo smo odlili v 50-mililitrsko centrifugirko (v vsaki centrifugirki smo imeli 33,3 ml kulture) in 20 minut centrifugirali pri 5000x g in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant. Celice smo spirali s sterilno ledeno hladno vodo (1/100 volumna izhodiščne kulture). Spiranje smo ponovili še dvakrat (vsakič smo dodali 33,3 ml ledeno hladne vode). Nato smo dodali 8 ml ledeno hladnega 10-odstotnega glicerola in ponovno centrifugirali 10 minut pri 5000x g in temperaturi 4 °C. Na koncu smo resuspendirali celice v 10-odstotnem ledeno hladnem glicerolu do končne koncentracije celic  $\sim 2 \times 10^{11}$  celic/ml in naredili alikvote po 40 µl, ki smo jih do uporabe shranili pri -80 °C (Ausubel, 1992).

Elektroporacija celic je potekala pri napetosti 1700 V. K 40 µl kompetentnih celic smo dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µL). Po elektroporaciji celic smo takoj dodali 1 ml gojišča SOC in transformacijsko mešanico inkubirali 60 minut s stresanjem pri 180 vrt./minuto in 37 °C. Nato smo različne alikvote kulture razmazali na trdna gojišča LB (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl ali 15 µl, 25 µl, 50 µl) in na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom (100 µl in 150 µl) ter inkubirali prek noči pri 37 °C (Ausubel, 1992).

Pri elektroporaciji sevov rodu *Acinetobacter* smo kot kontrolo uporabili plazmid ABA NKA. K 90 µl kompetentnih celic smo dodali 10 µl kontrolnega plazmida in smo naredili elektroporacijo po enakem postopku kot s plazmidno DNA pORF-hIL-12. Po 100 µl in 150 µl transformacijske mešanice smo razmazali na plošče z gojiščem LB in dodanim cefotaksimom ter inkubirali prek noči pri 37 °C (Ausubel, 1992).

Pri elektroporaciji sevov rodu *Escherichia* in *Klebsiella* smo kot kontrolo uporabili plazmid pUC19. 0,5 µl plazmida smo odpipetirali k 40 µl kompetentnih celic in naredili

elektroporacijo po enakem postopku kot s plazmidno DNA pORF-hIL-12. Po 100 µl in 150 µl transformacijske mešanice smo razmazali na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom ter inkubirali prek noči pri 37 °C (Ausubel, 1992).

#### 5.2.9.4 Transformacija sevov iz rodov *Kocuria* in *Micrococcus*

Prekonočno kulturo smo precepili v 100 mL gojišča LB, ki je vsebovalo 1,5 % glicina in smo celice inkubirali s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 30 °C, dokler OD<sub>600</sub> ni dosegla vrednosti 0,7. Potem smo kulturo celic odlili v 50-mililitrsko centrifugirko in 10 minut centrifugirali, in sicer pri 1400x g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili in celice dvakrat spirali z dvakratnim volumnom začetne kulture in enkrat z 2,85-krat manjšim volumnom hladne sterilne vode. Sledilo je dvakratno spiranje celic z 2,85-krat manjšim volumnom 10-odstotnega glicerola, na koncu pa smo celice resuspendirali v 10-odstotnem glicerolu in razdelili po 100 µl ter jih shranili, tako da smo jih zmrznili pri -80 °C (Matsumura in sod., 2011).

Pri elektroporaciji smo dodali 1 µl 10x razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µl) v 100 µl celic. Elektroporacija je potekala pri napetosti 2500 V. Po elektroporaciji smo takoj dodali 0,9 ml SOC gojišča in 16 ur inkubirali s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 150 vrt./minuto in temperaturi 30 °C. Različne alikvote kulture smo razmazali na trdno gojišče SOB (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl) in na trdno gojišče SOB z dodanim ampicilinom (100 µl in 150 µl) ter inkubirali pri 30 °C (Matsumura in sod., 2011).

#### 5.2.9.5 Transformacija sevov iz rodu *Rhodococcus*

Celice smo pripravili tako, da smo jih gojili v 100 ml gojišča BHI z 0,4 % dodane glukoze in jih 12–14 ur, oziroma dokler OD<sub>600</sub> ni dosegla vrednosti 0,6–0,8, inkubirali s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 250 vrt./minuto in temperaturi 37 °C. Nato smo kulturo 9 minut ogrevali na 50 °C in zatem hitro ohladili z intenzivnim mešanjem v ledeni vodi. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 10.000 vrt./minuto. Usedljino celic smo resuspendirali v 30 ml ledeno hladne raztopine EB. Celice smo nato še trikrat spirali z raztopino EB ter jih na koncu resuspendirali v 2 ml hladne raztopine EB z 15-odstotnim glicerolom. Celice smo alikvotirali po 100 µl in jih do uporabe hranili pri -80 °C (Sekizaki in sod., 1998).

Za elektroporacijo smo odmrznjenim celicam dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µl). Po elektroporaciji, pri napetosti 2500 V, smo celicam takoj dodali 1 ml

gojišča BHI z 20 mM MgCl<sub>2</sub> in inkubirali 1 uro pri 30 °C. Po 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl transformacijske mešanice smo razmazali na trdno gojišče BHI s 30-odstotnim konjskim mesnim ekstraktom ter 100 µl in 150 µl transformacijske mešanice na trdno gojišče BHI s 30-odstotnim konjskim mesnim ekstraktom in ampicilinom ter inkubirali prek noči pri 30 °C (Sekizaki in sod., 1998).

#### 5.2.9.6 Transformacija sevov iz rodu *Streptomyces*

Bakterije smo gojili 24 ur s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 250 vrt./minuto in temperaturi 30 °C v 100 ml gojišča CRM. Nato smo kulturo prelimi v 50-mililitrsko centrifugirko in 5 minut centrifugirali pri 10.000 vrt./minuto in temperaturi 4 °C. Usedlino bakterij smo resuspendirali v enakem volumnu ledeno mrzle 10-odstotne saharoze. Sledili so ponovno centrifugiranje in resuspendiranje v 1/2 volumnu ledeno mrzlega 15-odstotnega glicerola ter ponovno centrifugiranje. Nato smo bakterijsko usedlino resuspendirali v 15-odstotnem glicerolu z dodanim lizocimom (100 µg/ml) (v desetkrat manjšem volumnu od začetnega). Suspenzijo smo 30 minut inkubirali pri 37 °C in nato dvakrat sprali z ledeno hladnim 15-odstotnim glicerolom. Nato smo bakterije resuspendirali v 5 ml raztopine 30-odstotnega PEG 1000, 10-odstotnega glicerol in 6,5-odstotne saharoze, raztopljene v destilirani vodi. Suspenzijo smo razdelili na alikvote po 100 µl ter jih zamrznili pri -80 °C (Pigac in Schrempf, 1995).

Za transformacijo smo k 50 µl celic dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µl). Za elektroporacijo smo uporabili napetost 2000 V. Po elektroporaciji smo takoj dodali 0,75 ml ledeno hladnega gojišča CRM in transformacijsko mešanico inkubirali 3 ure s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 30 °C. Pred razmazom smo transformacijski mešanici dodali še tekoče gojišče CRM do končnega volumna 1 ml. Po 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl kulture transformiranih bakterij smo nato razmazali na trdno gojišče sojinega triptona ter 100 µl in 150 µl na trdno gojišče sojinega triptona z dodanim ampicilinom. Vse nacepljene plošče smo inkubirali 40 ur pri 30 °C (Pigac in Schrempf, 1995).

#### 5.2.9.7 Transformacija sevov iz rodu *Arthrobacter*

V 100 ml gojišča LB smo precepili 0,1 ml prekonočne kulture. Kulturo smo inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 30 °C, dokler OD<sub>600</sub> ni dosegla vrednosti 0,3–0,5. Potem smo dodali penicilin G (30 µg/ml) in inkubirali s stresanjem nadaljnjih 60 minut. Po končani inkubaciji smo celice 10 minut ohlajali v hladni vodi, nato

smo kulturo prelili v 50-mililitrsko centrifugirko in jo centrifugirali 15 minut pri 2000x g in temperaturi 4 °C. Usedlino celic smo nato sprali v ledeno hladnem pufru (10-odstotni glicerol + 0,5 M sorbitol). Na koncu smo dodali 500 µl hladnega pufra in naredili alikvote po 60 µl ter jih zamrznili pri -80 °C (Zhang in sod., 2011).

Za elektroporacijo smo celicam dodali 1 µl desetkrat razredčene plazmidne DNA (0,12 µg/µl) k 50 µl celic. Elektroporacijo smo izvedli pri napetosti 1500 V. Po elektroporaciji smo takoj dodali 0,8 ml gojišča LB z 0,5 M sorbitolom in inkubirali 8 ur s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 120 vrt./minuto in temperaturi 30 °C. Po 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl in 50 µl kulture smo razmazali na trdno gojišče LB ter po 100 µl in 150 µl na trdno gojišče LB z dodanim ampicilinom. Nacepljene plošče smo inkubirali prek noči pri 30 °C (Zhang in sod., 2011).

### **5.2.10 Preverjanje uspešnosti transformacije**

Iz vsake plošče smo iz štirih različnih kolonij pripravili bakterijske lizate. Za pripravo lizata smo pobrali kar največ bakterij, zraslih na gojišču brez dodanega ampicilina. Potem smo s pomočjo začetnih oligonukleotidov M\_A preverili prisotnost terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 na enak način in v enakih razmerah, kot je opisano v točkah 5.2.5 in 5.2.6.

Pri preverjanju prisotnosti kontrolnega plazmida ABA NKA (transformacija sevov iz rodu *Acinetobacter*) smo uporabili začetne oligonukleotid, označene z NDM, katerih nukleotidna zaporedja se nahajajo v preglednici 8.

V mikrocentrifugirko za PCR-reakcijo smo odpipetirali:

- po 1 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov NDM F1 in NDM R;
- 12,5 µl Dream Taq Green PCR Master Mix;
- 8,5 µl sterilne destilirane vode in
- 2 µl bakterijskega lizata.

Skupen volumen posamezne reakcijske mešanice je bil 25 µl. Pri pozitivni kontroli smo namesto bakterijskega lizata dodali 2 µl plazmida ABA NKA, pri negativni kontroli pa 2 µl sterilne destilirane vode.

Razmere, pri katerih smo izvajali reakcijo PCR za preverjanje prisotnosti kontrolnega plazmida ABA NKA, so navedene v preglednici 11.

Preglednica 11: Razmere za pomnoževanja plazmida gena  $bla_{NDM}$  iz plazmida ABA NKA z reakcijo PCR (Matjašič, 2012)

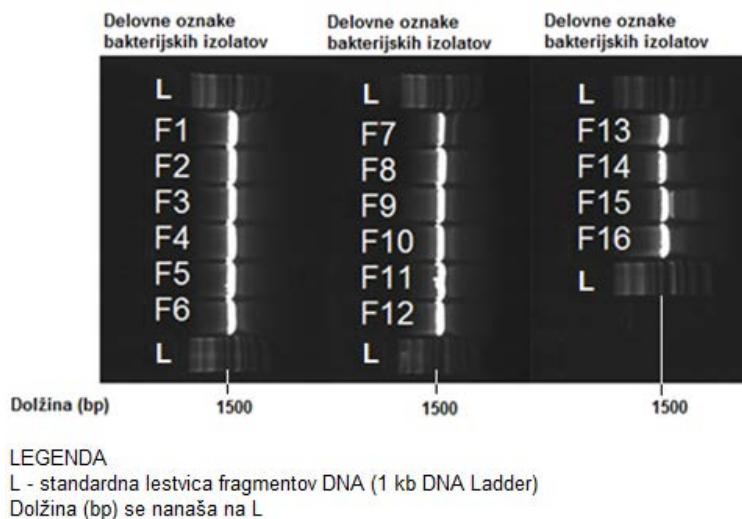
	TEMPERATURA	TRAJANJE	ŠTEVilo CIKLOV
1.	ZAČETNA DENATURACIJA DENATURACIJA	95 °C 94 °C	5 minut 30 sekund
2.	PRILEGANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	60 °C	30 sekund
	DOGRAJEVANJE VERIGE	74 °C	45 sekund
3.	KONČNO DOGRAJEVANJE VERIGE	74 °C	10 minut
			1x
			30x

V primeru uspešne transformacije terapevtskega plazmida smo transformanto precepili na novo ploščo z gojiščem LB in dodanim ampicilinom. Naslednji dan smo po navodilih proizvajalca izolirali plazmidno DNA pORF-hIL-12 s kompletom Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo izolirane DNA na agaroznem gelu.

## 6 REZULTATI

### 6.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH RODOV, KI SMO JIH IZOLIRALI IZ POVRŠINE KOŽE PSOV PRED IN PO TERAPIJI

Posamezne bakterijske seve, ki smo jih izolirali iz kože psov pred in po terapiji, smo uvrstili v rodove na podlagi nukleotidnega zaporedja PCR-pomnožkov gena za 16S rRNA (slika 5). Nukleotidna zaporedja smo analizirali s pomočjo programa Classifier na spletni strani Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Iz brisov kože pred terapijo smo tako do rodu opredelili 69 izolatov (preglednica 12). Nukleotidna zaporedja izolatov so podana v prilogi B.



Slika 5: Slika agaroznega gela po elektroforezi različnih PCR-pomnožkov gena za 16S rRNA. Z oznakami od F1 do F16 so označeni PCR-pomnožki iz bakterijskih lizatov psa F.

Iz brisov kože, odvzetih po terapiji, smo izolirali 89 različnih sevov, od katerih smo jih po analizi nukleotidnega zaporedja 53 uvrstili v 17 različnih rodov (preglednica 12). Nukleotidna zaporedja genov so navedena v prilogi C. 36 izolatov zaradi težav pri pomnoževanju gena za 16S rRNA oziroma slabe kakovosti dobljenega nukleotidnega zaporedja nam ni uspelo opredeliti.

Preglednica 12: Rodovi bakterij, ki smo jih izolirali iz kože psov pred in po terapiji

Identificirani rodovi bakterij, izolirani iz kože psov pred terapijo	Število identificiranih izolatov iz istega rodu	Identificirani rodovi bakterij, izolirani iz kože psov po terapiji	Število identificiranih izolatov iz istega rodu
<i>Acinetobacter</i>	1	<i>Acinetobacter</i>	9
<i>Arthrobacter</i>	1	<i>Agromyces</i>	1
<i>Bacillus</i>	18	<i>Bacillus</i>	8
<i>Enterococcus</i>	1	<i>Brachybacterium</i>	2
<i>Kocuria</i>	3	<i>Escherichia</i>	1
<i>Macroccoccus</i>	9	<i>Janibacter</i>	1
<i>Microbacterium</i>	10	<i>Kocuria</i>	1
<i>Micrococcus</i>	7	<i>Macroccoccus</i>	3
<i>Oceanobacillus</i>	1	<i>Microbacterium</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	1	<i>Micrococcus</i>	3
<i>Planococcus</i>	1	<i>Mycobacterium</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Oceanobacillus</i>	1
<i>Rhodococcus</i>	3	<i>Pseudomonas</i>	5
<i>Rothia</i>	2	<i>Rhizobium</i>	2
<i>Sporosarcina</i>	1	<i>Rhodococcus</i>	2
<i>Staphylococcus</i>	8	<i>Rothia</i>	2
<i>Streptomyces</i>	1	<i>Staphylococcus</i>	10

Seve, ki smo jih izolirali iz kože psov pred terapijo, smo nacepili na gojišče z dodanim ampicilinom (preverjanje odpornosti), na krvni agar (ugotavljanje hemolize) ter plošče LB, ki smo jih inkubirali pri temperaturah 30 in 37 °C. Ugotovili smo, da je bilo 21 sevov, izoliranih iz kože psov pred terapijo, odpornih proti ampicilinu. Od tega 8 izolatov iz rodu *Bacillus*, 4 izolati iz rodu *Staphylococcus*, 2 izolata iz rodu *Microbacterium* in po 1 izolat iz rodov *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Macroccoccus*, *Oceanobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* in *Sporosarcina*. Pri 27 izolatih smo na ploščah krvnega agraja zasledili hemolizo. Od tega je bilo 9 izolatov iz rodu *Bacillus*, po 5 izolatov iz rodu *Microbacterium* in *Staphylococcus*, 4 izolati iz rodu *Micrococcus*, 2 izolata iz rodu *Rhodococcus* ter po 1 izolat iz rodov *Oceanobacillus* in *Sporosarcina*. Pri večini sevov, izoliranih iz kože psov pred terapijo, smo opazili enako dobro rast pri obeh testiranih temperaturah inkubacije (preglednica 13).

Preglednica 13: Fenotipska opredelitev sevov, izoliranih iz kože psov pred terapijo. Odpornost proti ampicilinu, hemolitičnost ter rast pri temperaturah 30 in 37 °C.

OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	LB + Amp	Hemoliza na krvnem agarju	Rast pri 30 °C	Rast pri 37 °C
1A	<i>Micrococcus</i>	/	/	+	+
2A	<i>Bacillus</i>	/	/	+	+
3A	<i>Micrococcus</i>	/	/	+	+
5A	<i>Bacillus</i>	/	/	+	/
6A	<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+
7A	<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+
8A	<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+
9A	<i>Enterococcus</i>	+	/	+	+ (*)
10A	<i>Streptomyces</i>	/	/	+	+ (*)
12A	<i>Bacillus</i>	/	/	/	/
13A	<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+
14A	<i>Staphylococcus</i>	/	+	+	+
1C	<i>Acinetobacter</i>	+	/	+	+ (*)
2C	<i>Bacillus</i>	/	+	+	+
3C	<i>Bacillus</i>	+	/	+	+
4C	<i>Bacillus</i>	+	/	+	+
5C	<i>Bacillus</i>	/	/	+	+ (*)
6C	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+ (*)
7C	<i>Bacillus</i>	+	/	+	+ (*)
8C	<i>Bacillus</i>	+	/	+	+ (*)
9C	<i>Bacillus</i>	/	/	+ (*)	+
10C	<i>Paenibacillus</i>	/	/	+ (*)	+
13C	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+ (*)
14C	<i>Rhodococcus</i>	/	/	+ (*)	+
15C	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+
16C	<i>Bacillus</i>	/	+	+	+
17C	<i>Sporosarcina</i>	+	+	+ (*)	+
1D	<i>Kocuria</i>	/	/	+ (*)	+
2D	<i>Planococcus</i>	/	/	+ (*)	+
3D	<i>Microbacterium</i>	/	/	+ (*)	+
4D	<i>Micrococcus</i>	/	/	+ (*)	+
5D	<i>Kocuria</i>	/	/	+ (*)	+
6D	<i>Kocuria</i>	/	/	+ (*)	+
7D	<i>Bacillus</i>	/	+	+ (*)	+
8D	<i>Bacillus</i>	/	+	+ (*)	+
9D	<i>Microbacterium</i>	/	+	+ (*)	+
10D	<i>Microbacterium</i>	/	+	+ (*)	+

se nadaljuje

### nadaljevanje

OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	LB + Amp	Hemoliza na krvnem agarju	Rast pri 30 °C	Rast pri 37 °C
<b>11D</b>	<i>Rothia</i>	/	/	/	/
<b>12D</b>	<i>Microbacterium</i>	/	/	/	/
<b>13D</b>	<i>Rhodococcus</i>	/	+	+	/
<b>14D</b>	<i>Rothia</i>	/	/	/	/
<b>15D</b>	<i>Microbacterium</i>	/	+	+	+
<b>17D</b>	<i>Microbacterium</i>	/	+	+	+
<b>18D</b>	<i>Microbacterium</i>	/	/	/	/
<b>1E</b>	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+
<b>2E</b>	<i>Macrococcus</i>	+	/	+	+
<b>4E</b>	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+
<b>5E</b>	<i>Oceanobacillus</i>	+	+	+	+
<b>6E</b>	<i>Microbacterium</i>	+	+	+	+
<b>7E</b>	<i>Microbacterium</i>	+	+	+	+
<b>8E</b>	<i>Microbacterium</i>	/	/	/	/
<b>9E</b>	<i>Arthrobacter</i>	/	/	+	/
<b>10E</b>	<i>Bacillus</i>	/	/	+	/
<b>1F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+	+
<b>2F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	+	+	+ (*)
<b>3F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	+	+	+
<b>4F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+	+ (*)
<b>5F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+	+ (*)
<b>6F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	+	+ (*)	+
<b>7F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+ (*)	+
<b>8F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+ (*)	+
<b>9F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	+	+	+
<b>10F</b>	<i>Staphylococcus</i>	/	/	+	+
<b>11F</b>	<i>Staphylococcus</i>	/	/	+	+
<b>12F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+	+
<b>13F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+ (*)	+
<b>14F</b>	<i>Staphylococcus</i>	/	/	+	+
<b>15F</b>	<i>Pseudomonas</i>	+	/	+ (*)	+
<b>16F</b>	<i>Macrococcus</i>	/	/	+ (*)	+

Legenda:

A-F - delovne oznake psov, iz katerih so izolirani posamezni sevi; LB + Amp - gojišče LB z dodanim ampicilinom; + - opazili smo rast; \* - pri določeni temperaturi smo zabeležili boljšo rast seva; / - nismo opazili nobene rasti, ni hemolize

Izolate, ki nam jih zaradi težav pri pomnoževanju gena za 16S rRNA ali prekratkih nukleotidnih zaporedij slabe kakovosti ni uspelo uvrstiti v rodove, smo nacepili na gojišče UriSelect™ 4. To je kromogeno gojišče, na katerem enostavno identificiramo bakterije vrste *E. coli*. Ugotovili smo, da med neopredeljenimi izolati ni sevov vrste *E. coli*.

Pri vseh do rodu opredeljenih izolatih, pridobljenih iz kože psov po terapiji, smo ugotavljali odpornost proti ampicilinu, tako da smo jih nacepili na gojišče LB z dodanim ampicilinom. Ugotovili smo, da je bilo 32 od 53 izolatov odpornih proti ampicilinu. Od tega 9 izolatov iz rodu *Acinetobacter*, 8 izolatov iz rodu *Staphylococcus*, 5 izolatov iz rodu *Pseudomonas*, 3 izolati iz rodu *Bacillus*, po 2 izolata iz rodov *Rhizobium* in *Rhodococcus* ter po 1 izolat iz rodov *Agromyces*, *Micrococcus* in *Mycobacterium* (preglednica 14).

Preglednica 14: Odpornost izolatov, izoliranih iz kože psov po terapiji, proti ampicilinu.

OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	LB	LB + Amp
1BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
2BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
3BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
4BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
5BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
6BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
8BA	<i>Acinetobacter</i>	+	+
9BA	<i>Pseudomonas</i>	+	+
10BA	<i>Pseudomonas</i>	+	+
11BA	<i>Pseudomonas</i>	+	+
CA	<i>Mycobacterium</i>	+	+
1CA	<i>Rothia</i>	+	/
2CA	<i>Agromyces</i>	+	+
3CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
4CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
5CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
6CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
7CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
8CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
9CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
10CA	<i>Staphylococcus</i>	+	+
12CA	<i>Rothia</i>	+	/
13CA	<i>Bacillus</i>	+	+
5DA	<i>Brachybacterium</i>	+	/

se nadaljuje

### nadaljevanje

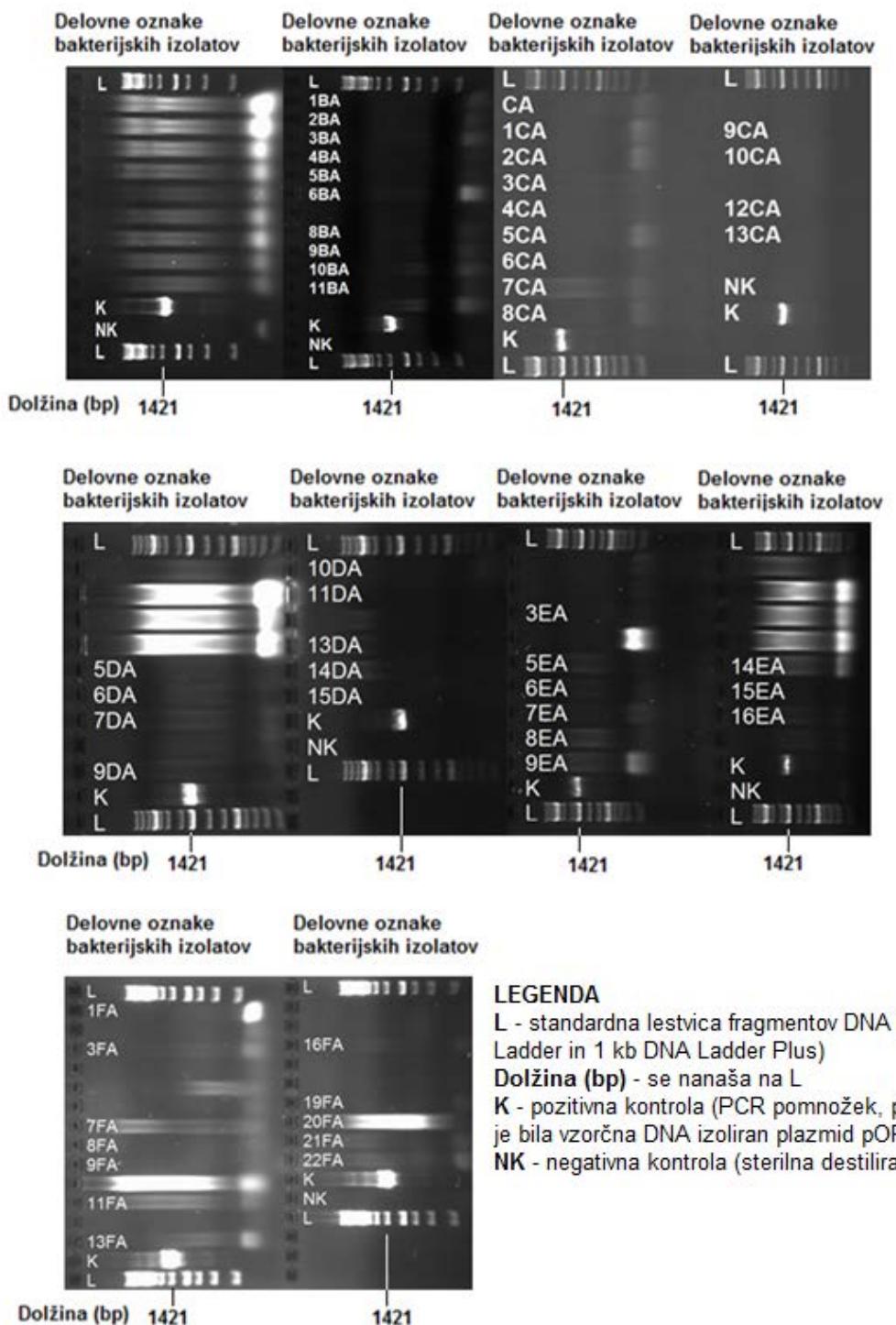
OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	LB	LB + Amp
<b>6DA</b>	<i>Brachybacterium</i>	+	/
<b>7DA</b>	<i>Oceanobacillus</i>	+	/
<b>9DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	/
<b>10DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	/
<b>11DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	+
<b>13DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	/
<b>14DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	/
<b>15DA</b>	<i>Bacillus</i>	+	/
<b>3EA</b>	<i>Bacillus</i>	+	+
<b>5EA</b>	<i>Micrococcus</i>	+	/
<b>6EA</b>	<i>Micrococcus</i>	+	+
<b>7EA</b>	<i>Micrococcus</i>	+	/
<b>8EA</b>	<i>Janibacter</i>	+	/
<b>9EA</b>	<i>Acinetobacter</i>	+	+
<b>14EA</b>	<i>Pseudomonas</i>	+	+
<b>15EA</b>	<i>Staphylococcus</i>	+	/
<b>16EA</b>	<i>Rhodococcus</i>	+	+
<b>1FA</b>	<i>Macrococcus</i>	+	/
<b>3FA</b>	<i>Macrococcus</i>	+	/
<b>7FA</b>	<i>Escherichia</i>	+	/
<b>8FA</b>	<i>Staphylococcus</i>	+	/
<b>9FA</b>	<i>Rhodococcus</i>	+	+
<b>11FA</b>	<i>Microbacterium</i>	+	/
<b>13FA</b>	<i>Kocuria</i>	+	/
<b>16FA</b>	<i>Rhizobium</i>	+	+
<b>19FA</b>	<i>Macrococcus</i>	+	/
<b>20FA</b>	<i>Pseudomonas</i>	+	+
<b>21FA</b>	<i>Acinetobacter</i>	+	+
<b>22FA</b>	<i>Rhizobium</i>	+	+

Legenda:

AA-FA - delovne oznake izolatov, izoliranih iz kože psov po terapiji; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti

## 6.2 PREVERJANJE PRISOTNOSTI TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 V SEVIH, IZOLIRANIH IZ KOŽE PSOV PO TERAPIJI

Pri vseh izolatih, dobljenih iz brisov kože po terapiji, smo z reakcijo PCR, za katero smo uporabili začetne oligonukleotide M\_A, preverili prisotnost 1421 bp velikega odseka terapevtskega plazmida pORF-hIL-12. Rezultati elektroforez PCR-pomnožkov na agaroznem gelu so prikazani na sliki 6. Na gelih so označene delovne oznake uspešno identificiranih izolatov. V nobenem izolatu, ki smo ga izolirali iz brisov kože po terapiji, nismo zaznali prisotnosti terapevtskega plazmida. Kot kontrolo smo uporabili PCR-pomnožek, pri katerem je bila vzorčna DNA izolirana plazmidna DNA pORF-hIL-12 (s koncentracijo 1,2 µg/µL).



#### LEGENDA

L - standardna lestvica fragmentov DNA (1kb DNA Ladder in 1 kb DNA Ladder Plus)

Dolžina (bp) - se nanaša na L

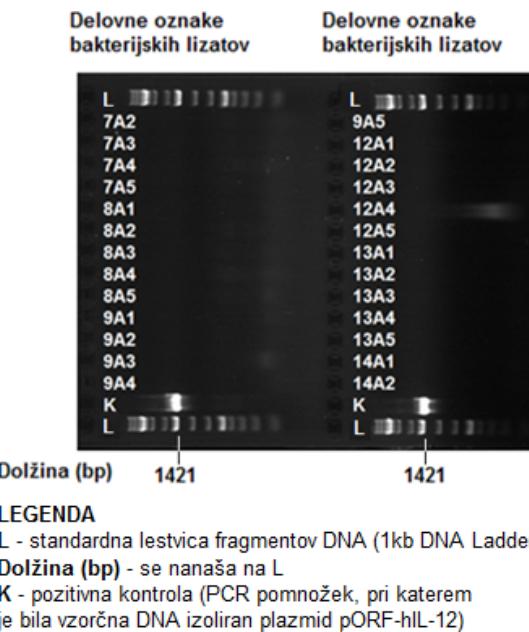
K - pozitivna kontrola (PCR pomnožek, pri katerem je bila vzorčna DNA izoliran plazmid pORF-hIL-12)

NK - negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

Slika 6: Preverjanje prisotnosti odseka plazmida pORF-hIL-12 v sevih, izoliranih po terapiji

## 6.3 POSKUS VNOSA TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA V BAKTERIJSKE CELICE TER PREVERJANJE ZADRŽEVANJA PLAZMIDNE DNA NA POVRŠINI BAKTERIJSKIH CELIC

V vse opredeljene seve, ki smo jih izolirali iz kože psov pred terapijo, v sev *E. coli* 7FA, ki smo ga izolirali po terapiji, ter v laboratorijske seve *E. coli* (MG1655, MG1655 *rec*<sup>-</sup>, DH5 $\alpha$ ) smo poskusili vnesti terapevtski plazmid brez predhodne obdelave bakterijskih celic ter uporabe električnih pulzov oziroma topotnega šoka. Ta postopek, ki je opisan v razdelku 5.2.8, smo v nadaljevanju označili kot »transformacija neobdelanih bakterijskih celic«. Uspešnost vnosa smo preverili z reakcijo PCR, za katero smo uporabili začetne oligonukleotide M\_A. Vzorčna DNA je bila celokupna genomska DNA v bakterijskih lizatih, ki smo jih pripravili iz dela kolonije po transformaciji. Pri 44 izolatih iz kože psov in laboratorijskem sevu *E. coli* DH5 smo pri trikrat spranih celicah, ki smo jih uporabili za pripravo lizata, dobili po reakciji PCR-pomnožek, značilen za pORF-hIL-12. Predvidevali smo, da obstaja možnost zadrževanja terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 na površini celic, kar bi nam lahko povzročilo lažno pozitivne rezultate. Zato smo v primeru pozitivnega rezultata po reakciji PCR povečali število spiranj s fiziološko raztopino in ponovili testiranje prisotnosti plazmida pORF-hIL-12. Posamezne izolate smo spirali trikrat, petkrat, desetkrat, 15-krat in 20-krat, oziroma dokler nismo po reakciji PCR dobili negativnega rezultata (ni bilo več PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid) (slika 7). Število spiranj je prikazano v preglednici številka 15. Največkrat (20-krat) smo spirali bakterijske celice sevov iz rodov *Paenibacillus* (10C) in *Macrococcus* (2E), medtem ko smo najmanjkrat spirali bakterijske celice sevov iz rodov *Bacillus* (12A, 7C, 8C, 16C, 7D, 8D), *Enterococcus* (9A), *Escherichia* (7FA, MG1655*rec*<sup>-</sup>, MG1655), *Kocuria* (1D), *Microbacterium* (12D, 15D, 6E, 12D), *Micrococcus* (1A, 3A in 4D), *Planococcus* (2D), *Sporosarcina* (17C) in *Staphylococcus* (6A, 7A, 8A, 13A in 14A).



Slika 7: Primer slike agarognega gela PCR-pomnožkov za preverjanja prisotnosti plazmida pORF-hIL-12 po transformaciji neobdelanih bakterijskih celic

Preglednica 15: Prikaz števila potrebnih spiranj, da odstranimo ostanke plazmidne DNA s površin bakterijskih celic

OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	ŠTEVILO SPIRANJ*	OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	ŠTEVILO SPIRANJ*
1A	<i>Micrococcus</i>	3x	12D	<i>Microbacterium</i>	3x
2A	<i>Bacillus</i>	/	13D	<i>Rhodococcus</i>	/
3A	<i>Micrococcus</i>	3x	14D	<i>Rothia</i>	/
5A	<i>Bacillus</i>	10x	15D	<i>Microbacterium</i>	3x
6A	<i>Staphylococcus</i>	3x	17D	<i>Microbacterium</i>	10x
7A	<i>Staphylococcus</i>	3x	18D	<i>Microbacterium</i>	/
8A	<i>Staphylococcus</i>	3x	1E	<i>Bacillus</i>	5x
9A	<i>Enterococcus</i>	3x	2E	<i>Macrococcus</i>	20x
10A	<i>Streptomyces</i>	10x	4E	<i>Bacillus</i>	5x
12A	<i>Bacillus</i>	3x	5E	<i>Oceanobacillus</i>	10x
13A	<i>Staphylococcus</i>	3x	6E	<i>Microbacterium</i>	3x
14A	<i>Staphylococcus</i>	3x	7E	<i>Bacillus</i>	5x
1C	<i>Acinetobacter</i>	5x	8E	<i>Microbacterium</i>	5x
2C	<i>Bacillus</i>	5x	9E	<i>Arthrobacter</i>	5x
3C	<i>Bacillus</i>	10x	10E	<i>Bacillus</i>	5x
4C	<i>Bacillus</i>	10x	1F	<i>Macrococcus</i>	10x
5C	<i>Bacillus</i>	5x	2F	<i>Micrococcus</i>	5x

se nadaljuje

### nadaljevanje

OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	ŠTEVILO SPIRANJ*	OZNAKA IZOLATA	UVRSTITEV V ROD	ŠTEVILO SPIRANJ*
6C	<i>Bacillus</i>	5x	3F	<i>Micrococcus</i>	5x
7C	<i>Bacillus</i>	3x	4F	<i>Macrococcus</i>	10x
8C	<i>Bacillus</i>	3x	5F	<i>Macrococcus</i>	10x
9C	<i>Bacillus</i>	5x	6F	<i>Micrococcus</i>	5x
10C	<i>Paenibacillus</i>	20x	7F	<i>Macrococcus</i>	5x
13C	<i>Rhodococcus</i>	5x	8F	<i>Macrococcus</i>	10x
14C	<i>Rhodococcus</i>	10x	9F	<i>Micrococcus</i>	5x
15C	<i>Bacillus</i>	/	10F	<i>Staphylococcus</i>	5x
16C	<i>Bacillus</i>	3x	11F	<i>Staphylococcus</i>	10x
17C	<i>Sporosarcina</i>	3x	12F	<i>Macrococcus</i>	10x
1D	<i>Kocuria</i>	3x	13F	<i>Macrococcus</i>	10x
2D	<i>Planococcus</i>	3x	14F	<i>Staphylococcus</i>	5x
3D	<i>Microbacterium</i>	/	15F	<i>Pseudomonas</i>	10x
4D	<i>Micrococcus</i>	3x	16F	<i>Macrococcus</i>	10x
5D	<i>Kocuria</i>	5x	14F	<i>Staphylococcus</i>	5x
6D	<i>Kocuria</i>	10x	15F	<i>Pseudomonas</i>	10x
7D	<i>Bacillus</i>	3x	16F	<i>Macrococcus</i>	10x
8D	<i>Bacillus</i>	3x	MG1655	<i>Escherichia</i>	3x
9D	<i>Microbacterium</i>	10x	MG1655rec <sup>-</sup>	<i>Escherichia</i>	3x
10D	<i>Microbacterium</i>	10x	DH5α	<i>Escherichia</i>	10x
11D	<i>Rothia</i>	/	7FA	<i>Escherichia</i>	3x

Legenda:

Število spiranj - pomeni število potrebnih spiranj bakterijskih celic v sterilni fiziološki raztopini pred pripravo bakterijskega lizata in preverjanjem prisotnosti odseka terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 z reakcijo PCR, da po elektroforezi nismo več zaznali za terapevtski plazmid značilnega PCR-pomnožka

Transformacije *E. coli* brez predhodne obdelave celic smo poskusili tudi po postopku iz članka Zhang in sod., in sicer v seve vrste *E. coli* (7FA, DH5α, HB101, CSH100). Po dodatku 10-krat redčenega plazmida pORF-hIL-12 (0,12 µg/µL) v suspenzijo bakterijskih celic smo jih takoj razmazali s sterilnimi steklenimi kroglicami na gojišče LB s 5-odstotnim agarjem in dodanim ampicilinom (110µg/ml). Po dvodnevni inkubaciji na nobeni plošči z uporabljenim gojiščem nismo zasledili bakterijskih kolonij.

#### 6.4 TRANSFORMACIJE DNA pORF-hIL-12 IN VITRO Z ELEKTROPORACIJO V IZBRANE SEVE, IZOLIRANE IZ POVRŠINE KOŽE PSOV

Za transformacijo smo izbrali izolate, ki niso bili odporni proti ampicilinu. Elektrokompetente celice smo pripravili po različnih protokolih, odvisno od bakterijskega rodu. Če v literaturi nismo našli metode za pripravo celic iz določenega rodu, smo uporabili metodo, ki je bila opisana za najbližji sorodni rod. Po elektrotransformaciji smo transformacijsko mešanico razmazali na ustreznih gojiščih, ki so opisana v razdelku 5.1.4. Rezultati so povzeti v preglednicah 16–23.

Po transformacijah različnih izolatov rodu *Staphylococcus* smo opazili rast transformiranih celic s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojišču LB ali gojišču BM (odvisno od protokola), medtem ko bakterije niso rasle na gojišču LB z dodanim ampicilinom ali gojišču BM z dodanim ampicilinom. Po kontrolni transformaciji, z za stafilokoke specifičnim plazmidom, plazmidom pUB110 Kan<sup>R</sup>, so zrasle transformante na gojišču LB z dodanim kanamicinom (preglednica 16). Kontrolne transformacije smo naredili za potrditev ustrezne izbire in izpeljavo postopka za transformacijo bakterij iz rodu *Staphylococcus*.

Preglednica 16: Rast sevov rodu *Staphylococcus* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pUB110 na različnih gojiščih

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Staphylococcus</i> (14A, 10F, 14F)	
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12	pUB110
LB	50 µl	+	n.t.
LB + Amp	150 µl	/	n.t.
LB + Kan	150 µl	n.t.	+
BM	50 µl	+	n.t.
BM + Amp	150 µl	/	n.t.

Legenda:

14A, 10F, 14F - delovne oznake izolatov rodu *Staphylococcus*, izoliranih iz kože psov pred terapijo; LB - gojišče LB; Amp - ampicilin; Kan - kanamicin; BM - gojišče Basic medium; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti; n.t. - ni testirano

Po transformacijah različnih izolatov rodu *Bacillus* smo opazili rast transformiranih celic s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojišču LB, medtem ko nismo opazili kolonij na gojišču LB z dodanim ampicilinom. Po kontrolni transformaciji celic s plazmidom pED302 smo opazili rast transformiranih bakterij na gojišču LB z dodanim kanamicinom (preglednica 17).

Preglednica 17: Rast sevov rodu *Bacillus* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pED302 na gojiščih LB

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Bacillus</i> (2A, 5C, 16C, 4E)	
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12	KONTROLA
LB	50 µl	+	n.t.
LB + Amp	150 µl	/	n.t.
LB + Kan	150 µl	n.t.	+

Legenda:

2A, 5C, 16C, 4E - delovne oznake izolatov rodu *Bacillus*, izoliranih iz kože psov pred terapijo; LB - gojišče LB; Amp - ampicilin; Kan - kanamicin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti; n.t. - ni testirano

Transformacije sevov iz rodu *Acinetobacter*, *Escherichia* in *Klebsiella* smo naredili po enakem postopku. Po transformacijah vseh teh izolatov smo opazili rast transformiranih celic s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojišču LB. Pri transformiranih celicah rodu *Acinetobacter* nismo opazili rasti na gojišču LB z dodanim ampicilinom, medtem ko smo pri transformiranih celicah izolatov rodu *Escherichia* in *Klebsiella* opazili tudi rast na gojišču LB z dodanim ampicilinom. Po kontrolni transformaciji celic *Acinetobacter* s plazmidom ABA NKA smo opazili rast transformiranih celic na gojišču z dodanim cefotaksimom. Na gojišču LB z dodanim ampicilinom smo opazili tudi rast celic rodu *Escherichia* in *Klebsiella*, ki smo jih transformirali s kontrolnim plazmidom pUC19 (preglednici 18 in 19).

Preglednica 18: Rast sevov rodu *Acinetobacter* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom ABA NKA na gojiščih LB

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Acinetobacter</i> (1C)	
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12	ABA NKA
LB	50 µl	+	n.t.
LB + Amp	150 µl	/	n.t.
CTX	100 µl	n.t.	+

Legenda:

1C - delovna oznaka izolata rodu *Acinetobacter*, izoliranega iz kože psa pred terapijo; LB - gojišče LB; Amp - ampicilin; CTX - cefotaksim; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti; n.t. - ni testirano

Preglednica 19: Rast sevov rodu *Escherichia* in *Klebsiella* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 in kontrolnim plazmidom pUC19 na gojiščih LB

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Escherichia</i> (MG1655, MG1655rec-, DHα5, 7FA)	<i>Klebsiella</i> (EXB-S17)
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12	pUC19
LB	50 µl	+	n.t.
LB + Amp	150 µl	+	+

Legenda: MG1655, MG1655rec-, DHα5, EXB-S17 - oznake laboratorijskih sevov; 7FA - delovna oznaka izolata rodu *Escherichia*, izoliranega iz kože psa po terapiji; LB - gojišče LB; Amp - ampicilin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti; n.t. - ni testirano

Za transformacije izolatov rodov *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* in *Arthrobacter* nismo imeli ustreznih pozitivnih kontrol. Po transformacijah različnih izolatov rodov *Kocuria* in *Micrococcus* smo opazili rast transformiranih celic na gojišču SOB, medtem ko po inkubaciji nismo opazili kolonij na gojišču SOB z dodanim ampicilinom (preglednica 20). Po transformacijah izolata rodu *Rhodococcus* smo opazili rast transformiranih celic na gojišču BHI+ME, medtem ko na gojišču BHI+ME z dodanim ampicilinom nismo zasledili kolonij (preglednica 21). Po transformaciji izolata rodu *Streptomyces* smo opazili transformante na triptonskem gojišču, ne pa na triptonskem gojišču z dodanim ampicilinom (preglednica 22). Tudi po transformaciji bakterij rodu *Arthrobacter* so zrasle transformante le na gojišču LB brez ampicilina (preglednica 23).

Preglednica 20: Rast sevov rodov *Kocuria* in *Micrococcus* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na gojiščih SOB

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Kocuria</i> (1D, 5D) <i>Micrococcus</i> (4D)
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12
SOB	50 µl	+
SOB + Amp	150 µl	/

Legenda: 1D, 5D, 4D - delovne oznake izolatov rodov *Kocuria* in *Micrococcus*, izoliranih iz kože psov pred terapijo; SOB - gojišče Super Optimal Broth; Amp - ampicilin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti

Preglednica 21: Rast sevov rodu *Rhodococcus* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na BHI + ME gojiščih

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Rhodococcus</i> (14C)
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12
BHI + ME	50 µl	+
BHI + ME + Amp	150 µl	/

Legenda:

14C - delovna oznaka izolata rodu *Rhodococcus*, izoliranega iz kože psov pred terapijo; BHI + ME - Brain heart infusion broth + 30-odstotni ekstrakt konjskega mesa; Amp - ampicilin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti

Preglednica 22: Rast sevov rodu *Streptomyces* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na TSBP gojiščih

Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Streptomyces</i> (10A)
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12
TSBP	50 µl	+
TSBP + Amp	150 µl	/

Legenda:

10A - delovna oznaka izolata rodu *Streptomyces*, izoliranega iz kože psov pred terapijo; TSBP - gojišče Tryptic soy broth; Amp - ampicilin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti

Preglednica 23: Rast sevov rodu *Arthrobacter* po transformaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 na LB gojiščih

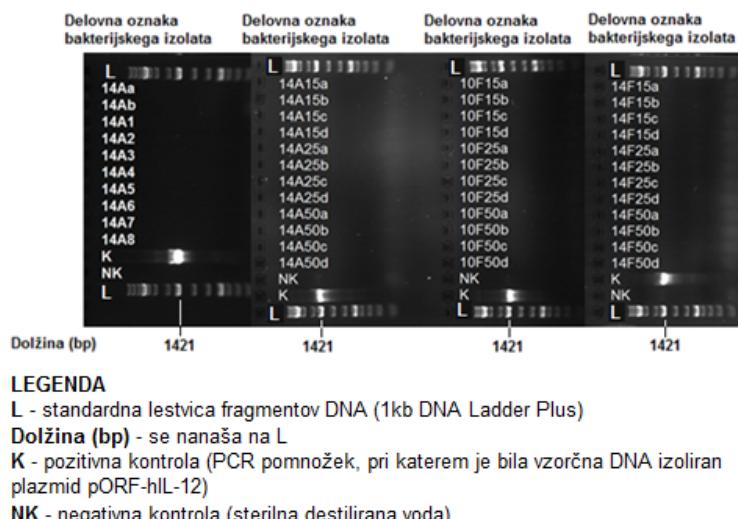
Rast transformiranih bakterijskih celic iz rodu:		<i>Arthrobacter</i> (9E)
Gojišče	Volumen transformacijske mešanice	pORF-hIL-12
LB	50 µl	+
LB + Amp	150 µl	/

Legenda:

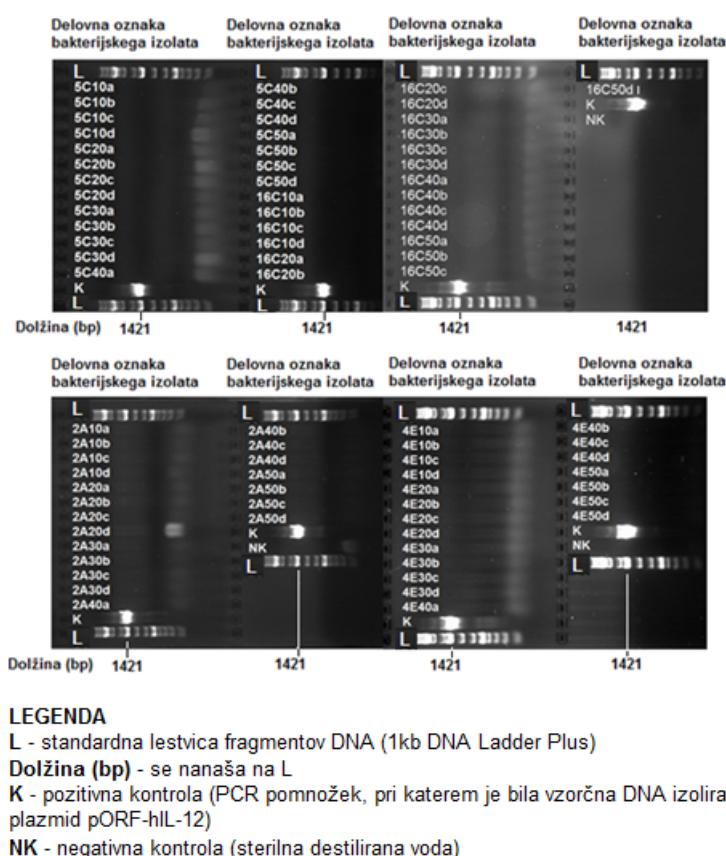
9E - delovna oznaka izolata rodu *Arthrobacter*, izoliranega iz kože psov pred terapijo; LB - gojišče LB; Amp - ampicilin; + - opazili smo rast; / - nismo opazili nobene rasti

Ker po transformacijah, razen v primerih transformiranih sevov *E. coli* in *Klebsiella*, nismo zasledili rasti na gojiščih z dodanim ampicilinom, smo sklepali, da ni prišlo do vnosa plazmida oziroma se gen za odpornost proti ampicilinu, zaradi sorodstvene oddaljenosti, v recipientskih rodovih ni izražal. Za izključitev slednjega smo pripravili po štiri bakterijske lizate iz kolonij celic, ki so zrasle po transformaciji na ploščah ustreznih gojišč brez dodanega

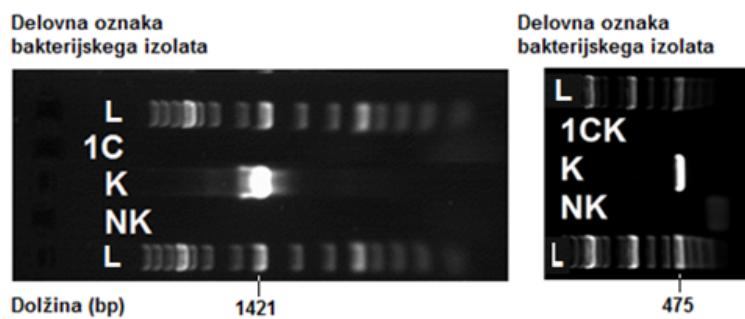
ampicilina. Bakterijski lizat smo uporabili kot vzorčno DNA za reakcijo PCR, s katero smo preverili prisotnost plazmida pORF-hIL-12. Na slikah 8–13 so posnetki gelov po elektroforezi PCR-pomnožkov. S slik je razvidno, da nam v nobenem primeru iz lizatov testiranih kolonij, zraslih po trasnformacijah na neselektivnem gojišču, ni uspelo pomnožiti odseka terapevtskega plazmida.



Slika 8: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Staphylococcus*, zraslih po *in vitro* transformaciji po 1. in 2. protokolu



Slika 9: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Bacillus*, zraslih po *in vitro* transformaciji



**LEGENDA**

L - standardna lestvica fragmentov DNA (1kb DNA Ladder Plus)

Dolžina (bp) - se nanaša na L

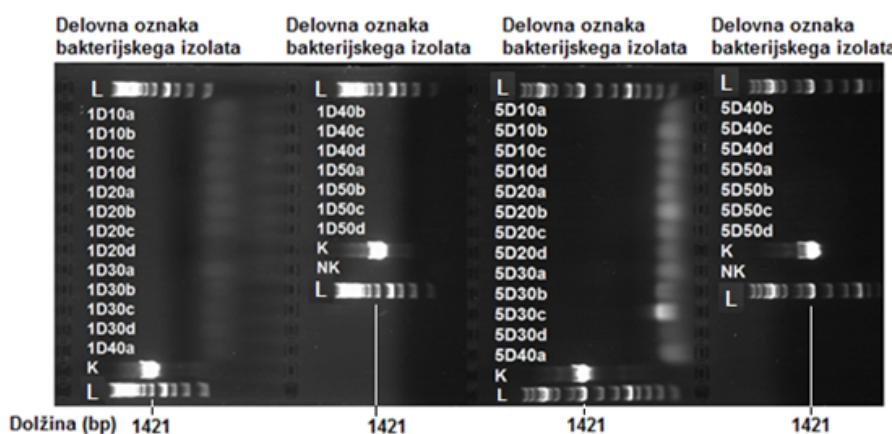
K - pozitivna kontrola (PCR pomnožek, pri katerem je bila vzorčna DNA izoliran plazmid pORF-hIL-12 ali plazmid ABA NKA)

NK - negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

1C - transformacija s plazmidom pORF-hIL-12

1CK - transformacija s kontrolnim plazmidom ABA NKA

Slika 10: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Acinetobacter*, zraslih po *in vitro* transformaciji



**LEGENDA**

L - standardna lestvica fragmentov DNA (1kb DNA Ladder in 1 kb DNA Ladder Plus)

Dolžina (bp) - se nanaša na L

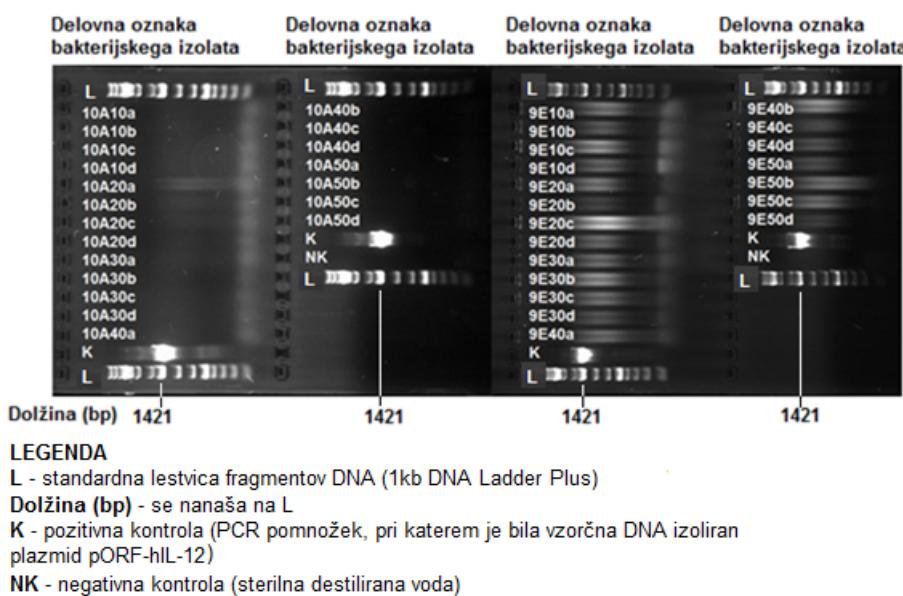
K - pozitivna kontrola (PCR pomnožek, pri katerem je bila vzorčna DNA izoliran plazmid pORF-hIL-12)

NK - negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

Slika 11: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Kocuria*, zraslih po *in vitro* transformaciji



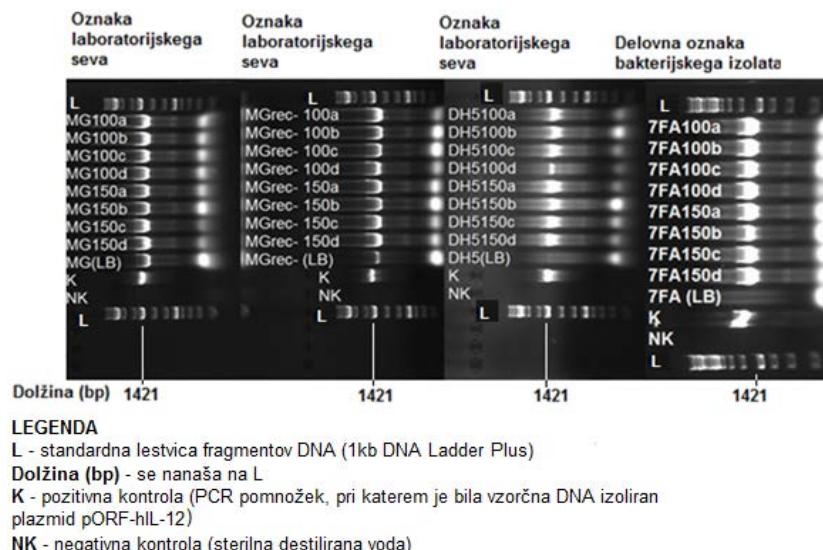
Slika 12: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Micrococcus* in bakterij rodu *Rhodococcus*, zraslih po *in vitro* transformaciji



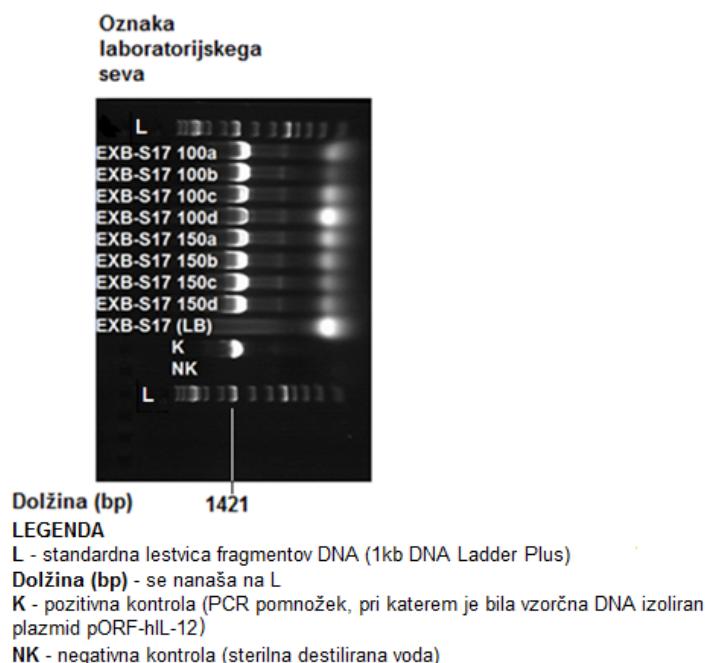
Slika 13: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Streptomyces* in bakterij rodu *Arthrobacter*, zraslih po *in vitro* transformaciji

V primerih, ko so po transformaciji zrasle kolonije na gojiščih z dodanim ampicilinom, smo sklepali, da je odpornost transformiranega seva posledica uspešnega vnosa terapevtskega plazmida in izražanja gena za odpornost proti ampicilinu. Prisotnost plazmida smo potrdili z reakcijo PCR. Vzorec je bila celokupna genomska DNA iz bakterijskih lizatov, ki smo jih pripravili iz kolonij, zraslih na plošči z ampicilinom. Za PCR smo uporabili začetne oligonukleotide M\_A. Po elektroforezi smo zaznali PCR-pomnožek ustrezne velikosti ter na

podlagi tega sklepali, da je bila *in vitro* transformacija uspešna pri vseh laboratorijskih sevih *E. coli* in *Klebsiella* ter izolatu *E. coli* 7FA, ki smo ga izolirali iz kože psa po terapiji (sliki 14 in 15).



Slika 14: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Escherichia* po *in vitro* transformaciji



Slika 15: Slika elektroforeze PCR-pomnožka, značilnega za terapevtski plazmid iz celokupne DNA bakterij rodu *Klebsiella* po *in vitro* transformaciji

Za končno potrditev uspešne transformacije smo nekaj transformant precepili na novo ploščo z gojiščem LB in dodanim ampicilinom. Naslednji dan smo s pomočjo kompleta Gene JET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit izolirali plazmidno DNA po navodilih proizvajalca. Prisotnost plazmida pORF-hIL-12 smo potrdili z elektroforezo (slika 16).



Slika 16: Slika agaroznega gela po elektroforezi plazmidne DNA pORF-hIL-12, ki smo jo izolirali iz transformant sevov EXB-S17, MGrec-, MG, 7FA in DH5 $\alpha$

Slike 16 je razvidno, da nam je iz vseh transformant bakterije rodu *Escherichia* in tudi bakterije rodu *Klebsiella* uspelo izolirati plazmidno DNA.

## 7 RAZPRAVA

Do sedaj so bile na predklinični in tudi klinični ravni narejene številne študije o potencialni protitumorski učinkovitosti IL-12. Terapija z rekombinantnim IL-12 se je izkazala za relativno učinkovito, vendar pa višji odmerki rekombinantnega IL-12 pri človeku lahko povzročijo prehodno imunosupresijo, anemijo, nevtropenijo, limfopenijo, trombocitopenijo, hiperglikemijo in hipoalbuminemijo (Pavlin in sod., 2012). Elektrogenska terapija je nova metoda zdravljenja v onkologiji, ki se že uporablja v klinični fazi raziskovanja v humani in veterinarski onkologiji. Pri genski terapiji se izognemo stranskim učinkom terapije z rekombinantnim IL-12, glede na objavljene raziskave pa ta tehnika ni povezana z resnejšimi lokalnimi in sistemskimi stranskimi učinki (Čemažar in sod., 2011).

Pavlin in sod. (2011) so za zdravljenje mastocitomov pri psih uporabili intratumoralno elektrogensko terapijo s plazmidom, na katerem je genski zapis za humani interlevkin IL-12 (pORF-hIL-12). Pri tem so merili tako lokalni odziv (meritve velikosti tumorja v različnih časovnih obdobjih po terapiji in histološka ocena vzorcev zdravljenih tumorjev) na terapijo kot tudi sistemski odgovor (določanje IL-12 in IFN- $\gamma$  v serumih pacientov). Morebitne stranske učinke so spremljali z določanjem osnovne krvne slike in izbranih biokemičnih vrednosti v serumu zdravljenih živali. Pri uporabi terapevtskih vektorjev, ki imajo poleg terapevtskega gena in drugih pomožnih zaporedij tudi seleksijski označevalec, ki je običajno gen z zapisom za odpornost proti antibiotiku, se pojavi vprašanje o možnosti horizontalnega prenosa teh genov v bakterije, ki so v bližini mesta aplikacije. V magistrski nalogi smo preučevali možnost horizontalnega prenosa genskega zapisa za odpornost proti ampicilinu v naravno prisotne bakterije na koži pri psih ter posledično prenos odpornosti proti antibiotikom iz laboratorija v okolje kot možno posledico genskega zdravljenja.

Najprej smo skušali ugotoviti, katere aerobne gojljive bakterije lahko izoliramo s klasičnimi metodami iz brisov kože psov pred gensko terapijo s plazmidom pORF-hIL-12. Nato smo ugotavljali, katere proti ampicilinu odporne bakterije lahko izoliramo po aplikaciji genske terapije in ali te bakterije vsebujejo terapevtski plazmid pORF-hIL-12. Poleg možnosti horizontalnega genskega prenosa *in vivo* smo ugotavljali tudi možnost vnosa terapevtskega plazmida z elektroporacijo v kompetentne celice *in vitro*.

Po izolaciji posameznih sevov smo jih na osnovi s PCR pomnoženega in v Macrogenu določenega nukleotidnega zaporedja za 16S rRNA identificirali do posameznih rodov. Pred terapijo smo izolirali iz kože psov 69 sevov največ iz rodov *Bacillus* (18), *Macroccoccus* (9), *Microbacterium* (10), *Staphylococcus* (8) in *Microccoccus* (7). Poleg tega pa smo izolirali tudi seve iz rodov *Kocuria* (3), *Rhodococcus* (3) in *Rothia* (2) ter po 1 sev iz rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Enterococcus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Sporosarcina* in *Streptomyces*. Iz brisov kože psov po terapiji smo izolirali 89 različnih sevov, vendar smo jih identificirali samo 53. Največ se jih je uvrstilo v rodove *Staphylococcus* (10), *Acinetobacter* (9), *Bacillus* (8) in *Pseudomonas* (5). Poleg tega pa smo izolirali tudi seve iz rodov *Micrococcus* (3), *Macroccoccus* (3), *Brachybacterium* (2), *Rhizobium* (2), *Rhodococcus* (2), *Rothia* (2) ter po 1 sev iz rodov *Agromyces*, *Escherichia*, *Janibacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Mycobacterium* in *Oceanobacillus*.

Dosedanje znanje o mikrobioti kože psa je precej pomanjkljivo (Weese, 2013). Ugotovljeno je, da iz kože psov izoliramo bakterije rodov *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* ter *Bacillus* in manj pogosto bakterije iz rodov *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas* in *Alcaligenes*, medtem ko se v črevesju nahajajo različne skupine enterobakterij, kot je *E. coli*, in različne anaerobe po Gramu negativne bakterije. Velik del črevesne mikrobiote se ne da gojiti in znanje o teh bakterijah je skromno (Sorum in Sunde, 2001; Krogh in Kristensen, 1976; Weese, 2013; The Merck Veterinary Manual, 2011). V naši raziskavi smo iz površine kože psov izolirali bakterije iz rodov, ki so jih opisali drugi avtorji, poleg tega pa smo izolirali tudi bakterije iz rodov, kot so *Kocuria*, *Arthrobacter* in *Rothia*. Te bakterije uvrščamo, tako kot rod *Micrococcus*, v družino *Micrococcaceae*. To so po Gramu pozitivni koki, ki jih izoliramo iz najrazličnejših naravnih okolji, kot so tla, rizosfera in voda, prav tako pa so tudi del komenzalne mikrobiote na koži in na sluznicah pri ljudeh (Liu, 2011). *Microbacterium* in *Agromyces* spadajo v družino *Microbacteriaceae*, ki jih izoliramo predvsem iz različnih tal ter so pogosto povezane z rastlinami in žuželkami (Evtushenko in Takeuchi, 2006). Rodova *Macroccoccus* in *Staphylococcus* uvrščamo v družino *Staphylococcaceae*. Mikroorganizme, ki se nahajajo na koži pri psih in pri ljudeh, lahko pridobimo z neposrednim stikom z okoljem. Raziskovalci so ugotovili, da imajo ljudje pogosto podobno kožno mikrobioto kože kot hišne živali, s katerimi so pogosto v stiku. Znano je tudi, da imajo lahko družinski člani zelo podobno črevesno mikrobioto kot njihove hišne živali (Song in sod., 2013).

Ugotovili smo, da je med identificiranimi izolati večina rodov, ki vsebujejo tudi patogene vrste bakterij. Ti rodovi so *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* ter *Streptomyces* (Liu, 2011). Bakterije rodu *Acinetobacter* povzročajo široki spekter nalezljivih bolezni, so pogosto odporne proti več različnim antibiotikom ter se predvsem povezujejo z bolnišničnimi okužbami (Joly-Guillou, 2005). Več različnih vrst bakterij iz rodu *Staphylococcus* je patogenih za človeka. *S. aureus* je vodilni vzrok bolnišničnih okužb in je odporen proti penicilinu in številnim drugim antibiotikom. Različni sevi *S. aureus* povzročijo različne bolezni (Gotz in sod., 2006). Tudi bakterije rodu *Pseudomonas* so odporne proti večini antibiotikov ter so oportunistični patogeni za ljudi. Pri rodu *Bacillus* sta najbolj znani patogeni vrsti *B. anthracis*, ki povzroča antraks, in *B. cereus*, ki povzroča zastrupitev s hrano. *M. tuberculosis* iz rodu *Mycobacterium* povzroča tuberkulozo. *E. coli* povzroča okužbe prebavnega trakta ali sečil. Patogene vrste bakterij iz rodu *Rhodococcus* so *R. fascians* in *R. equi* (Lui, 2011). Okužbe s temi vrstmi so redke, vendar lahko povzročijo hude okužbe pljuč in krvnega obtok (Spark in sod., 1993; Park in sod., 2011; Baba in sod., 2009). Pri rodu *Enterococcus* sta najpomembnejši patogeni vrsti *E. faecalis* in *E. faecium* (Vu in Carvalho, 2011). Bakterije iz rodu *Kocuria* so del običajne mikrobiote kože in ust pri ljudeh in drugih sesalcih. Poleg tega pa so občasno človeški patogeni, izolirani najpogosteje iz imunsko oslabljenih gostiteljev, kot so bolniki z rakom ali kroničnimi zdravstvenimi težavami (Dunn in sod., 2011; Savini in sod., 2010). Oportunistično patogene vrste bakterij pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom so lahko tudi bakterije iz rodov *Micrococcus* (Farinha in sod., 2013), *Janibacter* (Loubinoux in sod., 2005; Elsayed and Zhang, 2005) ter *Rothia* (Tomczak in sod., 2013; Morgan in sod., 2010). Iz rodu *Arthrobacter* so kot oportunistični patogeni priznani sevi *A. cumminsii*, *A. woluwensis* in *A. creatinolyticus* (Wauters, 2000; Bernasconi in sod., 2004). Več vrst iz rodu *Paenibacillus* lahko povzroči infekcijo pri ljudeh (Rieg in sod., 2010). Kljub tem podatkom iz literature ne moremo sklepati o številu patogenih vrst izoliranih bakterij, kajti izolatov nam ni uspelo opredeliti do vrste.

Seve, ki smo jih izolirali iz kože psov pred terapijo, smo nacepili na gojišče z dodanim ampicilinom (preverjanje odpornosti), na krvni agar (ugotavljanje hemolize) ter plošče LB, ki smo jih inkubirali pri temperaturah 30 in 37 °C. Ugotovili smo, da je bilo 21 sevov, izoliranih iz kože psov pred terapijo, odpornih proti ampicilinu. Pri 27 izolatih smo na ploščah krvnega agraja zasledili hemolizo, medtem ko smo pri večini sevov opazili enako dobro rast pri obeh testiranih temperaturah inkubacije (preglednica 13). Pri vseh do rodu opredeljenih izolatih,

pridobljenih iz kože psov po terapiji, smo ugotavljali odpornost proti ampicilinu, tako da smo jih nacepili na gojišče LB z dodanim ampicilinom. Ugotovili smo, da je bilo 32 od 53 izolatov odpornih proti ampicilinu (preglednica 14). Podatek o naravni odpornosti bakterij proti ampicilinu smo potrebovali za izbor sevov, ki smo jih transformirali s terapevtskim plazmidom *in vitro*. Za *in vitro* transformacije s plazmidom pORF-hIL-12 smo izbrali izolate, ki so bili občutljivi za ampicilin, tako da smo po transformaciji s terapevtskim plazmidom transformante lahko seleкционirali na gojišču z dodanim ampicilinom.

Da bi ugotovili, ali je prišlo do horizontalnega genskega prenosa, smo pri vseh izolatih, dobljenih iz brisov kože po terapiji, preverili prisotnost 1421 bp velikega odseka terapevtskega plazmida pORF-hIL-12. Pri tem smo ugotovili, da v nobenem izolatu, ki smo ga izolirali iz brisov kože po terapiji, ne zaznamo prisotnosti terapevtskega plazmida. Zaradi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da do horizontalnega genskega prenosa plazmida pORF-hIL-12 v naravno prisotne bakterije na koži psov ni prišlo.

Da bi preverili, kakšna je možnost naravne transformacije in pa naravne kompetence opredeljenih sevov, ki smo jih izolirali iz kože psov pred terapijo, smo poskusili vnesti terapevtski plazmid brez predhodne obdelave bakterijskih celic ter uporabe električnih pulzov oziroma toplotnega šoka. »Transformacijo neobdelanih bakterijskih celic« smo poskušali tudi s sevom *E. coli* (7FA), ki smo ga izolirali po terapiji, ter z laboratorijskimi sevi *E. coli* (MG1655, MG1655 $rec^-$ , DH5 $\alpha$ ).

Domneva se, da je naravna kompetenca razširjena med bakterijskimi vrstami, vendar je dejanski delež bakterij, ki v naravnih okoljih lahko postanejo kompetentne, večinoma neznan (Keese, 2008; Thomas in Nielsen, 2005). Študije so pokazale, da je aplikacija DNA brez dodatne kemične ali fizikalne pomoči relativno neučinkovita metoda prenosa genov (Čemažar in sod, 2011; Akhtar in sod., 2011). Poleg tega pa smo predvidevali, da obstaja možnost zadrževanja terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 na površini celic, kar bi nam lahko povzročilo lažno pozitivne rezultate. Zato smo v primeru pozitivnega rezultata po reakciji PCR povečali število spiranj s fiziološko raztopino in ponovili testiranje prisotnosti plazmida pORF-hIL-12. Posamezne seve smo spirali 3x, 5x, 10x, 15x in 20x. Iz tega dela poskusa je razvidno, da obstaja možnost lažno pozitivnih rezultatov, zaradi zadrževanja plazmida na površini bakterijskih celic. Lažno pozitivne rezultate smo dobili predvsem pri sevih, ki so imeli na ploščah z gojiščem LB lepljivo in sluzasto površino kolonij. Ugotovili

smo, da število spiranj celic s fiziološko raztopino ni odvisno od rodu bakterij. Tako smo na primer bakterije rodu *Bacillus* morali spirati trikrat, petkrat in tudi desetkrat. Enako velja tudi za druge rodove bakterij. Največkrat smo spirali seva bakterij rodu *Macrococcus* (2E) in *Paenibacillus* (10C), in sicer kar 20-krat.

Med vsemi izolati smo identificirali 1 sev *E. coli*, kar je bilo skrb vzbujajoče, glede na to, da se plazmid pORF-hIL-12 lahko podvaja v *E. coli*, poleg tega pa se gen za odpornost proti ampicilinu izraža s promotorja, ki je specifičen za *E. coli*. Da med neidentificiranimi izolati ni bilo sevov *E. coli*, smo dokazali z gojenjem teh izolatov na kromogenem gojišču UriSelect<sup>TM</sup> 4, na katerem so kolonije vrste *E. coli* roza do svetlorjave. Bakterijo *E. coli* redko izolirajo iz kože, zato načeloma ni prisotna v okolini podkožnih tumorskih nodulov psov. Prisotnost na koži je lahko posledica kontaminacije iz prebavnega ali urinarnega trakta (lizanje) (Weese, 2013). Vnos terapevtskega plazmida v seve *E. coli* iz površine kože je zaradi naravne nekompetence te vrste malo verjeten. Pri poskusu »transformacije neobdelanih bakterijskih celic« s sevom *E. coli* (7FA), ki smo ga izolirali po terapiji, ter z laboratorijskimi sevi *E. coli* (MG1655, MG1655 *rec*<sup>-</sup>, DH5α) smo prav tako dobili negativne rezultate. S tem delom poskusa smo dokazali, da ni možnosti horizontalnega genskega prenosa v opisane naravno nekompetentne bakterije.

Ker smo v literaturi zasledili novejšo raziskavo, v kateri avtorji opisujejo, da je *E. coli* sposobna spontanega vnosa plazmidne DNA med kultivacijo na trdnem gojišču pri 37 °C brez dodatka Ca<sup>2+</sup> ali toplotnega šoka (Sun in sod., 2006; Zhang in sod., 2012), smo poskusili z opisano metodo vnesti plazmid pORF-hIL-12 v seve vrste *E. coli* (7FA, DH5α, HB101, CSH100). Po dvodnevni inkubaciji na nobeni plošči s selekcijskim gojiščem nismo zasledili bakterijskih kolonij. Zaradi neuspešnega poskusa transformacije laboratorijskih uporabljenih sevov *E. coli* lahko zaključimo, da je transformacija DNA v nekompetentne bakterijske celice brez dodatne fizikalne pomoči, kot je elektroporacija, malo verjetna.

V magistrski nalogi smo poskusili vnesti DNA pORF-hIL-12 *in vitro* z elektroporacijo v izbrane, za ampicilin občutljive seve, izolirane iz površine kože psov. Kompetenco smo inducirali z različnimi postopki, odvisno od bakterijskega rodu. Na selekcijskih gojiščih z dodanim ampicilinom, razen v primeru transformiranih sevov *E. coli* in *Klebsiella sp*, nismo zasledili rasti kolonij ter smo sklepali, da ni prišlo do vnosa plazmida oziroma se gen za odpornost proti ampicilinu, zaradi sorodstvene oddaljenosti, v recipientskih sevih ni izražal.

Za izključitev slednjega smo pripravili lizate iz kolonij celic, ki so zrasle po transformaciji na ploščah ustreznih gojišč brez dodanega ampicilina. Bakterijski lizat smo uporabili kot vzorčno DNA za reakcijo PCR, s katero smo preverili prisotnost plazmida pORF-hIL-12. V nobenem primeru nam iz lizatov testiranih kolonij, zraslih po transformacijah na neselektivnem gojišču, ni uspelo pomnožiti odseka terapevtskega plazmida. S tem smo dokazali, da do transformacije celic v teh primerih res ni prišlo. Ustreznost protokolov za trasformacije smo potrdili s transformacijo plazmidov, specifičnih za posamezne rodove (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella* in *Staphylococcus*). V transformantah bakterij rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* in *Staphylococcus* nismo dokazali prisotnosti plazmida pORF-hIL-12, kar je verjetno posledica neskladne replikacijske regije oziroma nezmožnosti rekombinacije v kromosom recipientskega seva.

V primerih, ko so po transformaciji zrasle kolonije na gojiščih z dodanim ampicilinom, smo sklepali, da je odpornost transformiranega seva posledica uspešnega vnosa terapevtskega plazmida in izražanja gena za odpornost proti ampicilinu. Prisotnost plazmida smo potrdili z reakcijo PCR. Vzorec je bila celokupna genomska DNA iz bakterijskih lizatov, ki smo jih pripravili iz kolonij, zraslih na plošči z ampicilinom. Po elektroforezi smo zaznali PCR-pomnožek ustrezne velikosti ter na podlagi tega sklepali, da je bila *in vitro* transformacija uspešna pri vseh laboratorijskih sevih *E. coli* in *Klebsiella* ter izolatu *E. coli* 7FA. S tem smo dokazali, da je horizontalni genski prenos plazmida pORF-hIL-12 možen v bakterije rodov *Escherichia* in *Klebsiella*, vendar le z elektroporacijo v pripravljene kompetentne celice.

Za končno potrditev uspešne transformacije smo iz nekaj transformant izolirali plazmidno DNA pORF-hIL-12. Iz rezultatov je razvidno, da nam je iz vseh transformant bakterij iz rodov *Escherichia* in *Klebsiella* uspelo izolirati plazmidno DNA in s tem potrdili uspešen vnos terapevtskega plazmida v te seve.

Z vidika varnosti uporabe genske terapije v klinični praksi je lahko problematična prisotnost genskega zapisa za odpornost proti antibiotikom na vektorjih za vnos terapevtskega gena. Genski zapis bi se potencialno lahko prenesel v bakterije, ki so v bližini aplikacije genske terapije. Tveganje za zdravje ljudi na pORF-hIL-12 lahko predstavlja gen za ampicilinsko rezistenco, ki omogoča odpornost proti antibiotiku, ki se uporablja v humani in veterinarski medicini. Plazmid ima replikacijsko regijo pMB1, zato ga lahko namnožimo v sevu vrste *E.*

*coli*, kjer je ta replikacijska regija aktivna. Gen z zapisom za odpornost ima lastni promotor, specifičen za *E. coli*, tako da se izraža samo v sevih vrste *E. coli* in nekaterih sorodnih vrsta. Plazmid je nekonjugativen, vsi geni, ki omogočajo mobilizacijo plazmida, pa so odstranjeni. Gen za odpornost proti ampicilinu in spremljajoča zaporedja pORF-hIL-12 nimajo homolognih zaporedij, ki bi omogočala rekombinacijo odsekov plazmida v recipientski bakterijski celici. Poleg tega pa so študije pokazale, da je aplikacija DNA brez električnih pulzov relativno neučinkovita metoda transfekcije, zato je v primeru izločanja plazmida v okolico možnost prenosa plazmida v drugo žival ali človeka zanemarljiva, prav tako je zanemarljiva tudi učinkovita ekspresija transgena, posebej v toksičnih odmerkih.

S to nalogo nam je uspelo potrditi hipoteze, ki smo si jih zastavili na začetku dela. Plazmida z genom za odpornost proti ampicilinu po genski terapiji nismo izsledili v bakterijah, ki smo jih izolirali iz neposredne bližine aplikacije genske terapije po dveh in sedmih dneh. V *in vitro* razmerah ne moremo s horizontalnim genskim prenosom v bakterije, ki so del komenzalne mikrobiote na površini kože psov, vnesti terapevtskega plazmida, medtem ko v laboratorijske seve lahko vnesemo terapevtski plazmid. Poleg tega pa smo iz površine kože enega psa izolirali bakterijo rodu *Escherichia*, v katero nam je uspelo z *in vitro* transformacijo vnesti gen za odpornost proti ampicilinu. To je tudi bilo pričakovano glede na to, da plazmid vsebuje replikacijsko mesto in promotor gena za odpornost proti ampicilinu, specifičen za bakterijo rodu *Escherichia*.

Za zmanjšanje tveganja horizontalnega genskega prenosa gena z odpornostjo proti ampicilinu moramo povečati varnostne mere po genski terapiji, kar pomeni, da bi bilo potrebno popolnoma onemogočiti dostop psu do mesta aplikacije genske terapije. Glede na to, da smo bakterijo rodu *Escherichia* izolirali iz površine kože samo enega psa, je velika možnost, da je bakterija na kožo tega psa prišla iz prebavnega trakta psa ali človeške kože. Zaradi tega bi morali pacienti poleg obvezne imeti tudi zaščitno ovratnico, da bi popolnoma onemogočili dostop psa do mesta aplikacije genske terapije. Poleg tega bi bilo potrebno dodatno paziti tudi pri stiku človeške kože z mestom aplikacije. Kljub temu pa je možnost za horizontalni genski prenos gena z odpornostjo proti ampicilinu zanemarljiva, kajti naravna kompetenca bakterij ni pogosta, poleg tega pa je tudi vnos DNA v celice brez pomoči dodatne fizikalne metode, kot je elektroporacija, relativno neučinkovita. Glede na to, da je elektrogenska terapija raka z IL-12 učinkovita metoda zdravljenja raka, bi bilo potrebno razmišljati v smeri razvoja vektorja z drugačnim selekcijskim sistemom.

## 8 SKLEPI

Iz kože psov pred in po terapiji smo izolirali bakterije iz rodov *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* ter *Bacillus*, poleg tega smo našli tudi bakterije rodov *Pseudomonas*, *Macrococcus*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Arthrobacter*, *Enterococcus*, *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Agromyces*, *Sporosarcina*, *Streptomyces*, *Brachybacterium*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Escherichia*, *Paenibacillus*, *Mycobacterium* in *Janibacter*.

Potrdili smo obe hipotezi, ki smo si ju zastavili na začetku dela.

Horizontalnega genskega prenosa terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 med elektrogensko terapijo mastocitomov pri psih v naravno prisotne bakterije na koži psov v našem delu nismo dokazali.

V transformantah bakterij rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* in *Staphylococcus* nismo dokazali prisotnosti plazmida pORF-hIL-12, kar je verjetno posledica neskladne replikacijske regije oziroma nezmožnosti rekombinacije v kromosom recipientskega seva.

Horizontalni genski prenos pORF-hIL-12 je možen z elektroporacijo v inducirano kompetentne bakterije rodov *Escherichia* in *Klebsiella*.

## 9 POVZETEK

Obširnejše znanje o človekovem genomu in tehnološki napredek na področju molekularne biologije omogočata tudi razvoj genske terapije. Z vidika varnosti uporabe genske terapije v klinični praksi je lahko problematična tudi prisotnost genskega zapisa za odpornost proti antibiotikom na vektorjih za vnos terapevtskega gena. Genski zapis bi se potencialno lahko prenesel v bakterije, ki so v bližini aplikacije genske terapije.

Trenutno se za zdravljenje mastocitomov pri psih z elektrogensko terapijo z interlevkinom-12 uporablja komercialno dostopni terapevtski plazmid pORF-hIL-12 z zapisom za humani interlevkin-12. Rezultati kažejo, da je intratumoralna elektrogenska terapija s pORF-hIL-12 pasjih mastocitomov enostavno izvedljiv, preprost in varen terapevtski postopek, s katerim se lahko doseže lokalno izražanje transgena s sistemskim sproščanjem kodirane beljakovine. Plazmidni selekcijski označevalec je gen *bla*, z zapisom za odpornost proti ampicilinu. Gen za ampicilinsko rezistenco v plazmidu pORF-hIL-12 lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi, ker gre za razširjanje gena za rezistenco na medicinsko pomembni antibiotik.

V magistrskem delu smo ugotavljali možnost horizontalnega prenosa gena *bla* *in vivo* in *in vitro* v bakterije, ki smo jih izolirali iz površine kože psov pred in po genski terapiji.

Iz kože psov pred in po terapiji smo izolirali največ bakterij iz rodov *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* ter *Bacillus*, poleg tega pa smo našli tudi nekaj bakterij drugih rodov. Horizontalnega genskega prenosa terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 med elektrogensko terapijo mastocitomov pri psih v naravno prisotne bakterije na koži psov v našem delu nam ni uspelo dokazati. V transformantah bakterij rodov *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* in *Staphylococcus* nismo dokazali prisotnosti plazmida pORF-hIL-12, kar je verjetno posledica neskladne replikacijske regije oziroma nezmožnosti rekombinacije v kromosom recipientskega seva. Horizontalni genski prenos pORF-hIL-12 je možen z elektroporacijo v inducirano kompetentne bakterije rodov *Escherichia* in *Klebsiella*. Na podlagi dobljenih rezultatov in ob upoštevanju do sedaj znanih dejstev iz literature smo ocenili, da je tveganje za širjenje gena *bla* iz plazmida pORF-hIL-12 v druge, predvsem nesorodne bakterije zanemarljivo.

## 10 VIRI

- Akhtar N., Akram M., Asif H. M., Usmanghani K., Ali Shah S. M., Rao S. A., Uzair M., Shaheen G., Ahmed K. 2011. Gene therapy: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 1812–1817.
- Augustin J., Götz F. 1990. Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 66: 203–207.
- Ausubel M. F. 1992. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 740 str.
- Baba H., Nada T., Paterson D. L. 2009. First Case of Bloodstream Infection Caused by *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2667–2669.
- Bael T. E., Gollob J. A. 2007. Interleukin-12 and Cancer Therapy. V: Cytokines in the Genesis and Treatment of Cancer, Cancer Drug Discovery and Development. Vol. 4. Caligiuri A. M., Lotze M. T. (eds.). Totowa, NJ, Humana Press Inc.: 317–338.
- Bernasconi E., Valsangiacomo C., Peduzzi R., Carota A., Moccetti T., Funke G. 2004. *Arthrobacter woluwensis* subacute infective endocarditis: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 27–31.
- Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy H. V., Bonfante P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3005–3010.
- Bianco S. R., Sun J., Fosmire S. P., Hance K., Padilla M. L., Ritt M. G., Getzy D. M., Duke R. C., Withrow S. J., Lana S., Matthiesen D. T., Dow S. W., Bellgrau D., Cutter G. R., Helfand S. C., Modiano J.F. 2003. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Therapy*, 10: 726–736.
- Boto L. 2010. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*, 277: 819–827.
- Broothaerts W., Mitchell H. J., Weir B., Kaines S., Smith L. M. A., Yang W., Mayer J. E., Roa-Rodriguez C., Jefferson R. A. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433: 629–633.
- Büttner M., Belke-Louis G., Rziha H. J., McInnes C., Kaaden O. R. 1998. Detection, cDNA cloning and sequencing of canine interleukin 12. *Cytokine*, 10: 241–248.

- Cegnar M., Obermajer N., Kos J., Kristl J. 2007. Nosilni sistemi za dostavo bioloških učinkovin. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 210–247.
- Chuang T. F., Lee S. C., Liao K. W., Hsiao Y. W., Lo C. H., Chiang B. L., Lin X. Z., Tao M. H., Chu R. M. 2009. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. *International Journal of Cancer*, 125: 698–707.
- Colombo M. P., Trinchieri G. 2002. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13: 155–168.
- Coutelle C., Rodeck C. 2002. On the scientific and ethical issues of fetal somatic gene therapy. *Gene Therapy*, 9: 670–673.
- Čemažar M., Jarm T., Serša G. 2010. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Current Gene Therapy*, 10: 300–311.
- Čemažar M., Serša G., Pavlin D., Tozon N. 2011. Intramuscular IL-12 electrogene therapy for treatment of spontaneous canine tumors. *Targets in Gene Therapy*. Yongping Y. (ed.): 300–320.
- <http://www.intechopen.com/books/targets-in-gene-therapy/intramuscular-il-12-electrogene-therapy-for-treatment-of-spontaneous-canine-tumors> (januar, 2012).
- Čemažar M., Serša G., Wilson J., Tozer G. M., Hart S. L., Grosel A., Dachs G. U. 2002. Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Therapy*, 9: 399–406.
- De la Cruz F., Davies J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8: 128–133.
- Del Vecchio M., Bajetta E., Canova S., Lotze M. T., Wesa A., Parmiani G., Anichini A. 2007. Interleukin-12: Biological properties and clinical application. *Clinical Cancer Research*, 13: 4677–4685.
- Dow S. W., Elmslie R. E., Willson A. P., Roche L., Gorman C., Potter T. A. 1998. In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 2406–2414.
- Dröge M., Pühler A., Selbitschka W. 1998. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology*, 64: 75–90.

- Dunn R., Bares S., David M. Z. 2011. Central venous catheter-related bacteremia caused by *Kocuria kristinae*: Case report and review of the literature. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 10: 31–36.
- El-Aneed A. 2004. Current strategies in cancer gene therapy. European Journal of Pharmacology, 498: 1–8.
- Elsayed S., Zhang K. 2005. Bacteremia Caused by *Janibacter melonis*. Journal of Clinical Microbiology, 43: 3537–3539.
- Evtushenko L. I., Takeuchi M. 2006. The family *Microbacteriaceae*. V: The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. Vol. 3. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 1020–1098.
- Farinha A., Vaz A., Assunção J., Vinhas J. 2013. Unusual bacteria causing peritonitis in peritoneal dialysis - A single centre experience. Portuguese Journal of Nephrology and Hypertension, 27: 187–195.
- Franks L. M., Teich N. M. 1997. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press: 458 str.
- Frost L. S., Leplae R., Summers A. O., Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. Nature Reviews Microbiology, 3: 722–732.
- Gardlik R., Pálffy R., Hodosy J., Lukács J., Turňa J., Celec P. 2005. Vectors and delivery systems in gene therapy. Medical Science Monitor, 11: 110–121.
- Gehl J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiologica Scandinavica, 177: 437–447.
- Ginn S. L., Alexander I. E., Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. The Journal of Gene Medicine, 15: 65–77.
- Gotz F. Bannerman T., Schleifer K. H. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. V: The Prokaryotes. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Vol. 4. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 75 str.
- Hall R. M., Collis C. M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Molecular Microbiology, 15: 593–600.
- Hogge G. S., Burkholder J. K., Culp J., Albertini M. R., Dubielzig R. R., Keller E. T., Yang N. S., MacEwen E. G. 1998. Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines for the treatment of spontaneous canine cancer. Human Gene Therapy, 9: 1851–1861.

- Hogge G. S., Burkholder J. K., Culp J., Albertini M. R., Dubielzig R. R., Yang N. S., MacEwen E. G. 1999. Preclinical development of human granulocytemacrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Therapy*, 6: 26–36.
- Charpentier E. Helmholtz Centre for Infection Research. Neobjavljeno delo.
- Jezeršek Novaković B., Pajk B. 2009. Sistemsko zdravljenje raka. V: Onkologija - raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 156–183.
- Joly-Guillou M. L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 868–873.
- Keese P. 2008. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environmental Biosafety Research*, 7: 123–149.
- Kouraklis G. 2000. Gene therapy for cancer: from the laboratory to the patient. *Digestive Diseases and Sciences*, 45: 1045–1052.
- Kreft S., Doljak B., Obermajer N. 2007. Osnove genskega zdravljenja. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 592–625.
- Krogh H. V., Kristensen S. 1976. A study of skin diseases in dogs and cats. II. Microflora of the normal skin of dogs and cats. *Nordisk Veterinaermedicin*, 28: 459–463.
- Kümmerer K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 311–320.
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 6955–6959.
- Lee S., Margolin K. 2011. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3: 3856–3893.
- Levy S. B., Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement*, 10: 122–129.
- Liu D. 2011. *Micrococcus* and *Kocuria*. V: Molecular detection of human bacterial pathogens. Boca Raton, Florida, CRC Press: 111–115.
- Loubinoux J., Rio B., Bouvet A. 2005. Bacteremia caused by an undescribed species of *Janibacter*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3564–3566.
- Martinez José L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321: 365–367.

- Matjašič A. 2012. Detekcija genov za karbapenemaze po Gramu negativnih bakterij in konjugativni prijenos gena *bla*<sub>NDM-1</sub>. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 144 str.
- Matsumura E., Hamasaki M., Matsuyama A. 2011. Novel expression vector. European patent application EP 2 388 321 A1: 48 str.
- Molecular Cloning: A laboratory manual. 2001. 3rd ed. Sambrook J., Russell D.W. (eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 999 str.
- Morgan E. A., Henrich T. J., Jarell A. D., Shieh W. J., Zaki S. R., Marty F. M., Thorner A. R., Milner D. A., Velazquez E. F. 2010. Infectious granulomatous dermatitis associated with *Rothia mucilaginosa* bacteremia: A case report. The American Journal of Dermatopathology, 32: 175–179.
- Mott M. L., Berger J. M. 2007. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. Nature reviews - Microbiology, 5: 343–354.
- Nayerossadat N., Maedeh T., Abas Ali P. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Advanced Biomedical Research, 1: 11 str.  
<http://www.advbiores.net/article.asp?issn=2277-9175;year=2012;volume=1;issue=1;spage=27;epage=27;aulast=Nayerossadat>  
(maj, 2013).
- Netherwood T., Bowden R., Harrison P., O'Donnell A. G., Parker D. S., Gilbert H. J. 1999. Gene transfer in the gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5139–5141.
- Novaković S., Bračko M., Osredkar J., Skitek M., Podkrajšek M., Žagar I., Rener M., Kocijančič I., Salapura V., Jereb S. 2009. Diagnostika raka. V: Onkologija - raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 84–115.
- Ocena tveganja za sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje - elektrogenska terapija spontanih tumorjev psov s plazmidom pORF-hIL12. 2009. Darja Pavlin (ur.). Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 8 str.  
[http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso\\_ocena\\_tveganja.pdf](http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso_ocena_tveganja.pdf) (maj, 2012).
- Patil P. M., Chaudhari P. D., Megha S., Duragkar N. J. 2012. Review article on gene therapy. International Journal of Genetics, 4: 74–79.

- Park S. D., Uh Y., Jang I. H., Yoon K. J., Kim H. M., Bae Y. J. 2011. *Rhodococcus erythropolis* septicaemia in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 252–255.
- Pavlin D. 2010. Učinki električno posredovanega vnosa plazmidne DNA, ki nosi zapis za interlevkin-12, pri zdravljenju induciranih tumorjev miši in spontanih tumorjev psov. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 154 str. <http://www3.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/document.aspx?ID=77&Action=2&UserID=0&SessionID=4016&NavigationID=613> (junij, 2012).
- Pavlin D., Čemažar M., Cör A., Serša G., Pogačnik A., Tozon N. 2011. Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiology and Oncology*, 45: 30–39.
- Pavlin D., Tozon N., Pogačnik A., Čemažar M. 2005. Elektroporacija - nov sistem za dostavljanje zdravil v celice. *Veterinarske novice*, 31: 165–172.
- Pavlin D., Tozon N., Serša G., Pogačnik A., Čemažar M. 2006. Electrogene therapy in cancer treatment. *Slovenian Veterinary Research*, 43: 77–84.
- Pavlin D., Tozon N., Serša G., Pogačnik A., Čemažar M. 2008. Efficient electrotransfection into canine muscle. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 7: 45–54.
- Pavlin D., Čemažar M., Serša G., Tozon N. 2012. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *Journal of Translational Medicine*, 10: 234–245.
- Pigac J., Schrempf H. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomycetes* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 352–356.
- pORF-hIL-12 G2 - An expression vector containing the human Interleukin-12 open reading frame. Invivogen. [http://www.invivogen.com/PDF/pORF-hIL-12\\_G2\\_08A11-SV\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/pORF-hIL-12_G2_08A11-SV_TDS.pdf) (januar, 2012).
- Palaniswami Rajendran. 2011. Horizontal gene transfer - A tool for acquisition of genetic information for the evolution of bacterial variants. *Advanced BioTechnology*, 10: 14–17.
- Reed S. D., Fulmer A., Buckholz J., Zhang B., Cutrera J., Shiomitsu K., Li S. 2010. Bleomycin/interleukin-12 electrochemogene therapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs. *Cancer Gene Therapy*, 17: 457–464.
- Redberry Grace W. 2005. Gene Therapy in Cancer. New York, Nova Publishers: 228 str.
- Rieg S., Bauer T. M., Peyerl-Hoffmann G., Held J., Ritter W., Wagner D., Kern W. V., Serr A. 2010. *Paenibacillus larvae* bacteremia in injection drug users. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 487–489.

- Ruddon Raymond W. 2007. Cancer Biology. Oxford University Press: 530 str.
- Savini V., Catavitello C., Masciarelli G., Astolfi D., Balbinot A., Bianco A., Febbo F., D'Amario C., D'Antonio D. 2010. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 1395–1402.
- Scanlon K. J. 2004. Cancer gene therapy: Challenges and opportunities. *Anticancer Research*, 24: 501–504.
- Sekizaki T., Tanoue T., Osaki M., Shimoji Y., Tsubaki S., Takai S. 1998. Improved electroporation of *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 277–279.
- Selkirk S. M. 2004. Gene therapy in clinical medicine. *Postgraduate Medical Journal*, 80: 560–570.
- Serša G., Čemažar M., Miklavčič D., Rudolf Z. 2006. Electrochemotherapy of tumours. *Radiology and Oncology*, 40: 163–174.
- Serša G., Čemažar M., Snoj M. 2009. Electrochemotherapy of tumours. *Current Oncology*, 16: 34–35.
- Solomon J. M., Grossman A. D. 1996. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12: 150–155.
- Song S. J., Lauber C., Costello E. K., Lozupone C. A., Humphrey G., Berg-Lyons D., Caporaso J. G., Knights D., Clemente J. C., Nakielny S., Gordon J. I., Fierer N., Knight R. 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife - Microbiology and Infectious Disease*: 22 str. [http://www.colorado.edu/eeb/EEBprojects/FiererLab/Song\\_et al\\_2013\\_eLife.pdf](http://www.colorado.edu/eeb/EEBprojects/FiererLab/Song_et al_2013_eLife.pdf) (september, 2013).
- Sorum H., Sunde M. 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32: 227–241.
- Spark R. P., McNeil M. M., Brown J. M., Lasker B. A., Montano M. A., Garfield M.D. 1993. *Rhodococcus* species fatal infection in an immunocompetent host. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 117: 515–520.
- Strokovno mnenje - Intratumoralno injiciranje gole DNA, ki kodira gen za interlevkin 12 in električno posredovani vnos tega odmerka DNA v celice psov. 2009. Javornik Branka (ur.). Ljubljana, Znanstveni odbor za namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje izdelkov na trg: 5 str. [http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso\\_stroko\\_vno\\_mnenje.pdf](http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso_stroko_vno_mnenje.pdf) (junij, 2012).

- Sun D., Zhang Y., Mei Y., Jiang H., Xie Z., Liu H., Chen X., Shen P. 2006. *Escherichia coli* is naturally transformable in a novel transformation system. FEMS Microbiology Letters, 265: 249–255.
- Schwab Manfred. 2011. Encyclopedia of Cancer. Springer, New York. 3984 str.
- Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology, 4: 493–499.
- Thamm D. H., Kurzman I. D., Macewen E.G., Feinmehl R., Towell T. L., Longhofer S. L., Johnson C. M., Geoly F. J., Stinchcomb D.T. 2003. Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors. Cancer Immunology Immunotherapy, 52: 473–480.
- The Merck Veterinary Manual. 2011. Kahn C.M. (ed.). 9<sup>th</sup> ed. New York, Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/70900.htm> (februar, 2012).
- Thomas C. M., Nielsen K. M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nature, 3: 711–721.
- Tomczak H., Bilska-Stokłosa J., Osmola K., Marcinkowski M., Błażejewska W., Myczko K., Mańkowski B., Kaczmarek I. 2013. *Rothia mucilaginosa*, rarely isolated pathogen as an etiological factor of infection of soft tissues in young, healthy woman. Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 67: 1–5.
- Tortosa P., Logsdon L., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. Journal of Bacteriology, 183: 451–460.
- Van den Bogaard A. E., Stobberingh E. E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics - Links between animals and humans. International Journal of Antimicrobial Agents, 14: 327–335.
- Vu J., Carvalho J. 2011. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. Frontiers in Biology, 6: 357–366.
- Wauters G., Charlier J., Janssens M., Delmee M. 2000. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 38: 2412–2415.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697–703.

- Wells D. J. 2004. Gene therapy progress and prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Therapy*, 11: 1363–1369.
- Weese J. S. 2013. The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Veterinary Dermatology*, 24: 137–146.
- Xue G.-P., Johnson J. S., Dalrymple B. P. 1999. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods*, 34: 183–191.
- Zhang H., Li Y., Chen X., Sheng H., An L. 2011. Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid PART2. *Journal of Microbiological Methods*, 84: 114–120.
- Zhang Y., Shi C., Yu J., Ren J., Sun D. 2012. RpoS regulates a novel type of plasmid DNA transfer in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7: 11 str. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306417/pdf/pone.0033514.pdf> (maj, 2013).

## ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici prof. dr. Maji Čemažar za priložnost opravljanja magistrskega dela na področju, ki me najbolj zanima, ter za vse nasvete, pripombe in pomoč pri pripravi magistrskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Tanji Kunej za prevzem mentorstva ter za pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za potrpežljivost in pomoč pri načrtovanju izvedbe laboratorijskega dela, pri pisanju in oblikovanju naloge ter pri interpretaciji rezultatov. Poleg tega se doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin zahvaljujem tudi za natančen pregled magistrskega dela in vse nasvete, ki so prispevali k njegovemu izboljšanju.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim Skupine za molekularno genetiko (Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo), Onkološkega inštituta Ljubljana in Klinike za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju magistrskega dela. Predvsem se zahvaljujem Katji Molan za pomoč, predloge in nasvete pri laboratorijskem delu, Gregorju Bajcu za tehniško pomoč in dr. Zdravku Podlesku za pomoč pri elektroporaciji.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za hiter pregled oblikovne ustreznosti magistrskega dela.

Zahvaljujem se Nini, Urški, Andreji, Tjaši, Evi in Metki za razumevanje, najboljšo družbo in lepe spomine na študijske dni.

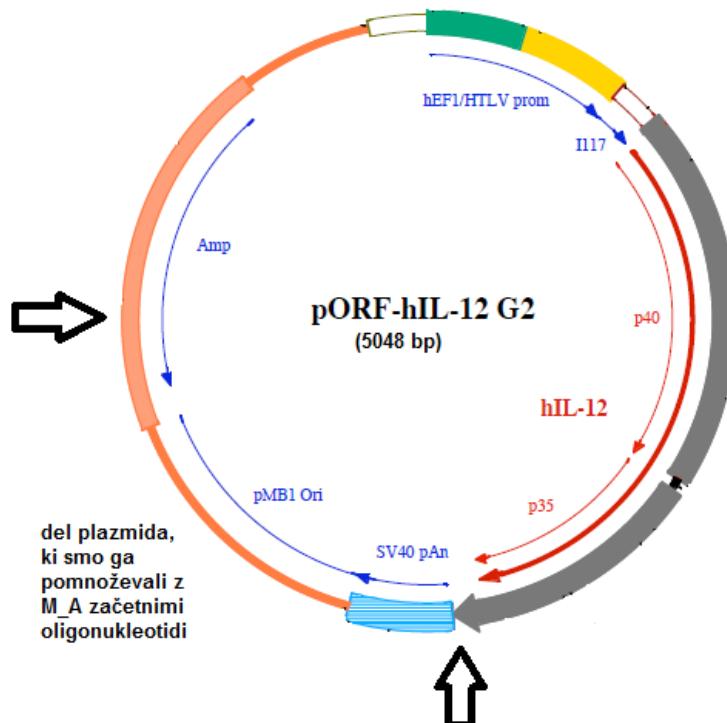
Zahvaljujem se tudi staršem in sestri za vso podporo in spodbudne besede med študijem. Iskreno se zahvaljujem za podporo in neizmerno potrpežljivost tudi možu Tihomirju.

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidno zaporedje in slika plazmida pORF-hIL-12. Interlevkin-12 je označen sivo poudarjeno, medtem ko je selekcijski gen za odpornost proti ampicilinu označen s črno barvo. Celoten plazmid je velik 5048 bp.

GATCTCGCAGTCGCCGGTGCCTGAGTGGGCAGAGCGCACATGCCACAGTCCCCGAGAAG  
TGGGGGGAGGGGTCGGAATTGAACCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAGTGGAAA  
GTGATGTCGTACTGGCTCCGCCTTTCCCAGGGTGGGGAGAACCGTATAAGTGCAGTAG  
TCGCCGTGAACGTTCTTCGCAACGGGTTGCCAGAACACAGCTGAAGCTCGAGGGCTC  
GCATCTCTTACGCCGCCCTACCTGAGGCCCATCCACGCCGGTGAAGTGCCTTC  
TGCCGCCTCCGCCGTGGTGCCTCTGAACCTGCCTCCGCTAGGTAAGTTAAAGCTCAGGT  
CGAGACCGGGCTTGTCCGGCCTCCCTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGCTCTCACCGCTT  
GCCTGACCTGCTCAACTCTACGTTCTGCTTCTGCCGTTACAGATCCAA  
GCTGTGACCGGGCCTAC gtaagtgatactactagattcaaaaagagtgtgacttgagcgctacaattgatacttagattcatcgagagg  
gacacgtcgactactaacccttccttccatcg CTGAGATCACCGCGAAGGAGGGCCACCATGGGTACCCAGCA  
GTTGGTCATCTCTGGTTTCCCTGGTTTCTGGCATCTCCCTCGTGGCCATATGGGAAC  
GAAGAAAAGATGTTATGTCGTAGAATTGGATTGGATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGG  
TCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTGGACCAGAGCAGTGAG  
GTCTTAGGCTCTGGCAAAACCCCTGACCATCCAAGTCAGAGTTGGAGATGCTGGCCAGTA  
CACCTGTCACAAAGGAGGCAGGGTTCTAAGCCATCGCTCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAG  
ATGGAATTGGTCCACTGATATTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAAATAGACCTTCTA  
AGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTAC  
TGATTGACATTCACTGCAAAAGCAGCAGAGGCTCTGACCCCCAAGGGTGACGTGCG  
GAGCTGCTACACTCTGCAGAGAGACTCAGAGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGT  
GGAGTGCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTCTG  
GTGGATGCCGTTACAAGCTCAAGTATGAAAACATACACCAGCAGCTCTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAGAACACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTGGCAGGTGG  
AGGTCACTGGAGTACCCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATT  
TGCCTCAGGTCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGACTTCAACGGACAAGA  
CCTCAGCCACGGCATCTGCCGAAAAATGCCAGATTAGCGTGGGGCCAGGACCGCTA  
CTATAGCTCATCTGGAGCGAATGGCATCTGTGCCCTGCACT **GTTCCTGGAGTAGGGTAC**  
**CTGGGGTGGGC**GCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCATGCC  
CACCACCTCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAAGCAACATGCTCCAGAACGGCCAGACAAACTCT  
AGAATTTCACCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCA  
GCACAGTGGAGGCCTGTTACCATGGAATTAAACCAAGAACATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGA  
GAACTCTTCTATAACTAATGGAGTTGCCTGGCTCCAGAAAGACCTCTTTATGATGGC  
CTGTGCCTTAGTAGTATTATGAAGACT **T**CGAAGATGTACCGAGGTGGAGTTCAAGACCATGA  
ATGCAAAAGCTCTGATGGATCCTAACAGAGGCAGATCTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTT  
ATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCC  
TGAAGAACGGATTTTATAAAACTAAACAGCTCTGCATACTTCTCATGCTTCAAGAAT  
TCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTCCAAAAAG**CGAGGTCCC**  
**T**CCAAACCGTTGTCATTTTATAAAACTTGAATGAGGAAACTTGATAGGATGTGGATTAAAGA  
ACTAGGGAGGGGAAAGAAGGATGGACTATTACATCCACATGATACCTCTGATCAAGTATTTT  
GACATTACTGTGGATAAATTGTTTAAGTTTCTGATGAATTGCTAAGAAGGGGGAAATTCT  
TTGCTTTTACCTCGA **CTAGCTCGACATGATAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCAAA**  
CTAGAATGCAGTAAAAAAATGCTTATTGTAACCAATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAATTGC  
ATTCAATTATGTTCAAGGTTAGGGAGGGTGTGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAACACCAATTGC  
AAATGTGGTAGATCATTAAATGTAATTAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG  
AACCGTAAAAAGGCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA  
AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAGAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTCCCC  
TGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCGTGGACCCCTGCCGCTACCGGATACCTGTCGCCCTTC  
CCTCGGGAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGTCGTT  
GCTCCAAGCTGGCTGTGCAAGAACCCCCGTTCAAGCCGACCGCTGCGCCTATCCGTTAACT  
ATCGTCTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG  
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAAGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGGGCTAACTACGGCTA  
CACTAGAAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGG

TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGAT  
TACGCGCAGAAAAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT  
GAACGAAAACACTACGTTAAGGGATTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCT  
TTAAATTAAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTT  
CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTCGTCATCCATAGTTGCCGA  
CTCCCCGTCGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTAACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGA  
TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCGCCAGCCGAAGGGCC  
GAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCT  
AGAGTAAGTAGTCGCCAGTTAATAGTTGCGAACGTTGCTTGCAATTGCTACAGGCATCGTGGTG  
TCACGCTCGTCGTTGGTATGGCTTCATTCACTCCGGTCCCTCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCT  
TCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGGTCCCTCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG  
GCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGAA  
GATGCTTTCTGTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCCGGGACCGA  
GTTGCTCTGCCGGCGTAATACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCA  
TCATTGGAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGCA  
TGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTCAGCATCTTACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGC  
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGAATAAGGGCAGACGGAAATGTTGAATACTC  
ATACTCTTCCTTTCAATATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT  
TTGAATGTATTTAGAAAATAAACAAATAGGGGTTCCCGCACATTCCCAGAAAGTGCCACCTG  
ACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTC  
GTCTCGCGCGTTGGTATGACGGTAAAACCTCTGACACATGAGCTCCGGAGACGGTCACA  
GCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCG  
GTGTCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGGATCT  
CGAGCGGCCGCAATAAAATATCTTATTTCATTACATCTGTGTTGGTTTTGTGAATCGTA  
ACTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAACAAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCA  
GTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTCTCTATCGAA



Priloga B: Nukleotidna zaporedja za identifikacijo izolatov, izoliranih iz kože psov pred terapijo. Pred zaporedjem sta navedena delovna oznaka izolata in ime identificirane kulture.

**A1 - *Micrococcus***

GAAGATGCGGGCTACACATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGTGGTGATTAGTGGCGAAC  
GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACACTCTGGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAATA  
CCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTGGAAAGATTATCGGTTTGGATGGACTCGCGG  
CCTATCAGCTTGTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT  
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG  
ACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACC  
TCCTTCAGTAGGGAAAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAACGACCCGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGAGCTCGTAG  
GCGGTTTGTGCGCTCTGCGTAAAGTCCGGGCTTAACCCCGATCTGCGGTGGGTACGGGAGA  
CTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGA  
ACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGC  
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGCACTAGGTGTGGGACCATT  
CACGGTTCCGCGCCGAGCTAACGCAATTAGTCCCCCCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTAA  
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCACAAGCGCGGAGCATCGGATTAAATCGATGCAACGC  
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATGCCGTAGAGATACGGTTCCCTTGGGTG  
GGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG  
AGCGAACCCCTCGTCCATGTTGCCAGCAGTCGTGTTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTC  
AACTCCGGAGGAAAGTGAAGGACGACGTAAATCATCATGGCCCCATTATGTTGGGTTCCCCCA  
TGCTACAATGGCGGGTACAATGGGTTGCGAAACTTGGGAGGGGGAGCTAATCCCCAAAAGCCCG  
GCTCCATTGCGATTGGGGCTGCACTCCAACCCATGAAATCCGGAGTCGTTGAATCCGAAT

**A2 - *Bacillus***

GTAGCCAGCGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGATCGATGGGAGCTTGTCCCTGAGATTAGCGGC  
GGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGGAGCT  
AAATACCGGATACGTTCTTCTCGCATGAGAGAAGATGAAAGACGGTTACGCTGTCACTTATAG  
ATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTGATGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAACGAAGAACGCTTC  
GGTCGTAAGTCTGTTAGGGAGAACAAAGTACCAAGAGTAAGTGTGGTACCTTGACGGTA  
CTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTTAGGTGGCAAGCGTT  
GTCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG  
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCA  
GTGTAGCGGTAAATCGTAGAGATTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGACTTTCTGGTCTGT  
AACTGACACTGAGGCAGCAGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC  
TAAACGATGAGTCTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGTGCTCAGCTAACGCAATTAGCAC  
TCCGCTGGGAGTACGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCACAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCTTGACCAA  
CCCTAGAGATAGGGCTTCCCTCGGGGACAGAGTGCAGGGTGGTGCATGGTTGCGTAGCTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTGTGCAATTCA  
GTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAAATCAT  
CATGCCCTTATGACTTGGGTTACAACCTGGCTCAAAGGGAGGGACAAAGGGTGCCAACCTCCG  
AAGGGAGCGAATCCCTAAAGGCATCTCCATTGGATTCAAGTGGACTCCCTGCTAAACCGGATCC  
TTAATCGATCCTGCCGGATCGTCGGTGTCTCCCGCTACTAATAAGCAGATTAAAT

**A3 - *Micrococcus***

GGACGGGGTGTACACATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGTGGTGATTAGTGGCGAACG  
GGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACACTCTGGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAATAC  
CGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTGGAAAGATTATCGGTTTGGATGGACTCGCGG  
CTATCAGCTTGTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT  
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC  
ACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCCTCGGGTTGTAAACCT  
CTTCAGTAGGGAGAACAGCGAAAGTGCAGGTACCTGCAGAAGAACGACCCGCTAAACTACGTGCC  
GCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCGGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGG  
CGGTTGCGCTGCGTAAAGTCCGGGGCTTAACCCGGATCTGCGGTGGTACGGCAGAC  
TAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGA

CACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAC TGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCG  
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTC  
ACGGTTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTAAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGCGGAGCATGCCGATTAATCGATGCAACCG  
AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATGCCGTAGAGATAACGGTTCCCTTGGGGTGG  
GTTCACAGGTGGTGCATGGTTCTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACG  
GCGCAACCCCTCGTCCATGTTGCCAGCACGCTGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCA  
ACTCCGGAGGAAGGTTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTTGGCTCCCCAT  
GCTAACATGGCGGGTACAATGGGTTGCGAAACTTGGAGGTGGAGCTAACCCAAAAAGCCGG  
TCCGTTTGGATTGGGGTTGAAATCCGACCCATGAAATCGGAATCCCTAGTAATCCGAATCAC  
AAACTCCT

#### A5 - *Bacillus*

GGACGGGGTGTATACATGCAGTCAGCGATCGATGGGAGCTTGTCCCTGAGATTAGCGCGGA  
CGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCCTATAAGACTGGATAACTTCGGAAACCGGAGCTAA  
ACCGGATACGTTCTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGGTTACGCTGTCACTTATAGATG  
GGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCATGCGTAGCCGACC  
TGAGAGGGTGTGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAACGAAGAAGGCCCTCGGG  
TCGTAAGTTCTGTTAGGAAAGAACAACTACAGAGTAACGCTGGTACCTTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTTGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA  
ACCGTGGAGGGTCACTGGAAACTGGGAACTTGAGTCAGAACAGGAAAGTGAATTCCAAGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCAGCTTCTGGTCTGTAAC  
GACACTGAGGCAGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
CGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG  
CCTGGGGAGTACGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTAATCGAACGCAACCGAAGAACCTTACAGGTTGACATCCTGACAACCC  
AGAGATAGGGCTTCCCGTGGGGACAGAGTGACAGGTGGTAGGTTGTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGGGCAACCCCTGATCTAGTGCAGCATTAGTTG  
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGGACAAACGGAGGAAGGTGGGGATAACGTCAAATCATCATG  
CCCCTATGACCTGGCTACCACCTGCTACAATGAATGGTACAAAGGGTGGCAACCTCCGAAGGT  
AGCGAATTCTAAAGCCTTCTCATTGGATTGAAGTGGAAATCCCTGCTGAACCGGATC

#### A6 - *Staphylococcus*

GAGCATGCCGTGTATACATGCAGTCAGCGACAGATAAGGAGCTTGTCCCTTGACGTTAGCG  
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGG  
CTAATGCCGATAACATGTTGAACCGCATGGTTCTACAGTGAAGAACGGTCTGTCACTTATA  
GATGGACCCCGCCGTATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAGCATACGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGTGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGGTCTT  
CGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTAAGTAACGTCACATCTGACGGTA  
CTAACCGAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTTGCAAGCGTT  
ATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC  
TCAACCGTGGAGGGTCACTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTCAGAACAGGAAAGTGAATTCCATG  
TGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATAAGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCCTTCTGGTCTGCA  
ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT  
CCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTAATCGAACGCAACCGAAGAACCTACCAAAATCTGACATCCTTGACCGCT  
CTAGAGATAGAGTTCCCTTCGGAGGGACAAAGTGACAGGTGGTAGGTTGTCAGCTCGT  
GTCCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAAAGCGCAACCCCTTGAACCTTAATTGCCATCATT  
TCAGTTGGGGACTCTAAATTGAATGGCCGGTGACAAAACCGAAGAGAAAGT

#### A7 - *Staphylococcus*

GGGATAGCGGTGTATACATGCAGTCAGCGACAGATAAGGAGCTTGTCCCTTGACGTTAGCG  
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGG  
TAATGCCGATAACATGTTGAACCGCATGGTTCTACAGTGAAGAACGGTCTGTGTCACCTTATA  
ATGGACCCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAGCATACGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTGTGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG

TAGGGAATCTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTCTTC  
GGATCGAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAAATGTGAAGTAACACTGTGCACATCTGACGGTAC  
CTAACCGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
TCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACGGCT  
CAACCCTGGAGGGTCAATTGAAACTGGAAAACCTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATTCCATGT  
GTAGCGGTGAAATCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCAAGGCCTTCTGGTCTGCAA  
CTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGTTAGTCCACGCC  
AACGATGAGTCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGCAGCTAACGCATTAAGCACT  
CGCCTGGGAGTACGGTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCG  
GGAGCATGTGGTTAACATCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAATCTGACATCCTTGACCGCT  
CTAGAGATAGAGTTTCCTCTCGGAGGACAAAGTGACAGGTGGTCATGGTTGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCAACCCCTGAACCTAGTGCATCATTCA  
TGGGCACTCTAAGTGTAGTCCGGTACACACGTGCTACAATGGACCATACAAAGGGACCGAAACCGCGAG  
GGCAACAAATCCCCAAAAATTGTTCTCAGTCCGAATT

**A8 - *Staphylococcus***

AAAGGAAGAGCTGCCATAACATGCAGGTGCGAGCGAACAGATAATGAGCTGCTCCTTGACGT  
TAGCGCGGACCCCTGTATAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAAC  
CGGGGCTAATGCCGATAACATGTTAACCGCATGGTTCTACAGTGAAGAGACGGTCTGCTGTAC  
TTATAGATGGACCCCGCCGTATTAGCTAGTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCACGATAACG  
TAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGAAATCTCCGAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAG  
GTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAAATGTGAAGTAACACTGTGCACATCTGA  
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAA  
GCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGGCC  
ACGGCTAACCGTGAGGGTCAATTGAAACTGGAAAACCTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATT  
CCATGTGTAGCGGTGAAATCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCAAGGCCTTCTGGT  
CTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGTTAGTCCAC  
GCCGTAAACGATGAGTCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGCAGCTAACGCATTA  
GCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTAACATCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAATCTGACATCCTTGA  
CCGCTCTAGAGATAGAGTTTCCTCTCGGAGGACAAAGTGACAGGTGGTCATGGTTGTCAG  
CTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACCAAGCGCAACCCCTTAAGCTAGTTGCCA  
TCATTTCAGTTGGCACTCTAAATTGACTGCCGGTGGACAAACCGGAAGGAAAGGTGGGG  
GATGAACGTCAA

**A9 - *Enterococcus***

GCGACCGGTGCTATAACATGCAGTCACGCTTCTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAG  
AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATCAGAAGGGATAACACTTGG  
AACAGGTCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTGATTGAAAGGCCTTCGGGT  
TCGCTGATGGATGGACCCCGGGTGCATTAGCTAGTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCACGA  
TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTAGGAAATCTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGTGAGTGA  
AGAAGGTTTCGGATCGTAAACACTCTGTTAGAGAAGAACAGGATGAGAGTAACGTTCATC  
CCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAG  
TGGCAAGCGTTGTCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTGAGTGCAGAAAGAGGAGAG  
TGGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATCGTAGTATATGGAGGAACACCAGTGGCAAGGC  
CTCTGGTCTGTAACGCTGAGGCTGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGTCCACGCCGTAACGATGAGTCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCAGCTAAC  
GCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
CGCACACAGCGTGGAGCATGTGGTTAACATCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTGACA  
TCCTTGACCAACTCTAGAGATAGAGCTCCCTCGGGGAAAGTGACAGGTGGTCATGGTTGT  
CGTCAGCTGTGAGATGTTGGGTTAACATCGGCAACGAGCGCAACCCATTATTGTTAGTGC  
CATCATTCAAGTTGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTACAAACCGGAAGGAAAGTGGGATGAC  
TCAAATCATCATGCCCTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACCAAGT  
CCGAAATCCGAGGGTAAGCTATTCTCAAAGCTTCCAGTCCGAATGCAGGGTGAATT

**A10 - *Streptomyces***

GTGCCAGCGGGCTACACATGCAGTCACGATGAACCGCTTCGGCGGGATTAGTGGCGAACGG  
GTGAGTAACACGTGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGACAAGCCCTGAAACGGGGCTAATACC  
GGATATGACCGTCTGCCGATGGTGATGGTAAAGCTCCGGCGGTGAGGATGAGCCCGGGC  
CTATCAGCTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCAGCAGCGGAGCAGCAGTGGGAATATTGC  
ACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCCTCGGGTTGAAACCT  
CTTCAGCAGGGAAAGAAGCGAAAGTACGCTGAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCCGGTAATACGTAGGGCAAGCGTTGTCGAAATTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGG  
CGGCTGTACGTGGTTGTGAAAGCCGGCTAACCCGGTCTGAGTCGATAACGGCAGG  
CTAGAGTCGGTAGGGAGATCGGAATTCCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA  
ACACCGGTGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGC  
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGGTGGGACTAGGTGTGGCAACATT  
CACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCTAACGCTAACAGCCCCCTGGGAGTACGGCCGAAAGGCTAA  
AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGCGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGC  
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGGCCCCCTGTGGTC  
GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCAGCTCGTCCTGAGATGTTGGGTTAAATCCCCAACAA  
AACGCAACCCTGTCACCAAGGCTTGAGAGAACGGGGGAGCAATCAAATCATTGCGCCCTATATT  
TTGGGCTT

**A12 - *Bacillus***

GTTAGCGGGGACCGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCGGAA  
ACCGGGGCTAACCGGATAATTGGACTGCATGGTCGAAATTGAAAGGGCGCTCGGCTGT  
CACTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGAT  
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGTAG  
AAGGCTTCGGCTGAAAACCTGTTAGGAAAGAACAAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCAC  
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTATCCGAATTATGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTAAGTGTGAA  
AGCCCACGGCTAACCGT

**A13 - *Staphylococcus***

GAGACAGCGGTGCTATACATGCAGTCAGCGACAGATAAGGGAGCTGCTCCTTGACGTTAGCG  
GCGGACGGGTAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGAAACCGGG  
CTAATGCCGATAACATGTTGAACCGCATGGTCTACAGTGAAGAACGGCTTGCTGTCACTTATA  
GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTGGTAGGGTAACGGCTACCAAGGGAGCATACGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGTGAAAGGTCTT  
CGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGACATCTGACGGTA  
CTTAACCAAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
ATCCGAATTATGGCGTAAAGCGCGTAGGCCTAGGCCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC  
TCAACCGTGGAGGGTATTGGAAAACCTGAGTGCAGAACAGGAAAGTGGAAATTCCATG  
TGTAGCGGTAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTTCTGGTCTGCA  
ACTGACGCTGATGTGCGAAACGCTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGTAGTGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTAGTGTGTCAGCTAACGCTAACG  
TCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTAATTGAGCAAGAACGCGAAGAACCTACCAAATCTGACATCCTTGACCG  
CTCTAGAAAATAGAGTTTCTCTGGAGGACAAAGTACGACAGGTGGGGCATGGTTGTCGTACC  
TCCTGTCCTGAGAAAATTGGGTTAAATCTCCCCACCAAAGCCAACCCCTGAAATTATTGCTCCT  
TTCATTGGGACCCCT

**A14 - *Staphylococcus***

GAACATGCGCGTGCTATACATGCAGTCAGCGACAGATAAGGGAGCTGCTCCTTGACGTTAGCG  
GCGGACGGGTAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGAAACCGGG  
CTAATGCCGATAACATGTTGAACCGCATGGTCTACAGTGAAGAACGGCTTGCTGTCACTTATA  
GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTGGTAGGGTAACGGCTACCAAGGGAGCATACGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGTGAAAGGTCTT  
CGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGACATCTGACGGTA

CCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
ATCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCTAGCGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC  
TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCATG  
TGTAGCGGTAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTGGTCTGCA  
ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCTTAAGCACT  
CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTAATCGAACGCGAACAAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTGACCGCT  
CTAGAGATAGAGTTTCTCTCGGAGGACAAAGTACAGGTGGTAGTGGTCTGAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGAACCCCTGAACCTAGTTGCCATTCAGT  
TGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATAACGTCCAATCATC  
CTGCCCCCTATAATTGGGCTACACACCTGCTCAATGGACATATAAAAGGGGGCGAAACCGC  
GAGGGCAGCAAAACCCCTAAAATTGTTCCCTTCGGAT

**C1 - *Acinetobacter***

GCTTAAACTTGCAAGTCGAGCGGGAAAGTTACCTGCTACCTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAATGCTTATGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACCTTCCGAACGGATCTAATATCCCTCTACC  
CTACTTTGAAATCTGAAACCTC

**C2 - *Bacillus***

GTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGATAGTCCTGAACCGCATGGTTC  
AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGG  
GGTAATGGCTACCAAGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTAGGCCACACTGGACT  
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCGCAATGGACGAAAGTCTG  
ACGGAGCAACGCCGTGAGTGTAGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAAC  
AAAGTGCAGAGTAACGCTCGCACCTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTCCGGATTATTGGCGTAAAGGGCTCGCA  
GGCGGTTCTTAAGTGTAGTGAAGGCCCCGGCTAACCGGGCAGGGTATTGAAACTGGGA  
AACTTGAGTGCCCACCAAGGATAGTGGAAATTCC

**C3 - *Bacillus***

GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTATAAGACTGGATAACTCGGGAAACCGGAG  
CTAATACCGGATACGTTCTTCGCATGAGAGAAAGATGGAAAGACGGTTACGCTGTCACTTAT  
AGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCACGATGCGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGTAGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTAGGAAATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAACGAAGAAGGCCT  
TCGGGTCGTAAGTCTGTTAGGAAAGAACAGTACCAAGAGTAACGCTGGTACCTGACGGT  
ACCTAACGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAACGCT  
TGTCCGGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTGTAGTGAAGGCCCCACGG  
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCAA  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACCAAGTGGCAAGGGACTTCTGGTCTGT  
AACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCG  
TAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCTTAAGCAC  
TCCGCTGGGAGTACGGCCCAAGGCTAAACAGGAATTGACGGGG

**C4 - *Bacillus***

TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTATAAGACTGGATAACTCGGGAAAC  
CGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTCGCATGAGAGAAAGATGGAAAGACGGTTACGCTGTCA  
CTTATAGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCACGATGC  
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGTAGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGAAATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAACGAAGA  
AGGCCCTCGGTCGTAAGTCTGTTAGGAAAGAACAGTACCAAGAGTAACGCTGGTACCTT  
GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGC  
AAGCGTTGTCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTGTAGTGAAGC  
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG  
ATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACCAAGTGGCAAGGGACTTCT  
GGTCTGTAACGACTGAGGGCGAACAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTC  
CACGCCGTACACGATGAGTGCTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCACCTAGTGCTGCAGCTAACGCAT  
TAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAA

**C5 - *Bacillus***

TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTATAAGACTGGATAACTCGGGAAAC  
CGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTCGCATGAGAGAAGATGGAAGACGGCCTATCTGTC  
ACTTATAGAGGGGCCCGCGGCATTATCTATTGGTAGGGTAGGGCTCACAGGGCACAATG  
CGTACCCAACCTGAGAGGGTAGTCGGCACACGGGACTGAAACACGGCCAACCCCTACGGGA  
GGCAGCAGTAGGAAATCTCCGAGTGGACAAAAGTCTGACGGAGCAACCCCGCGTAACAAAA  
AGGGCCTCGGGTCTGAAAGTCTGTTAGGGAAAACAAGTACCAAGAGTAACGTGGGTACC  
TTGACGGTACCTAACCAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCACCGCGGTAAACGTAGGTG  
GCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAA  
GCCACCGCTACCCGTGGAGGGTCTTGAAAACGGAAACTGAGTGCAAAAAAGGA

**C6 - *Bacillus***

AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCGGGAA  
AACCGGGCTAATACCGGATAATATTGAACTGCATGGTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTG  
TCACTTATGGATGGACCCCGCGTCGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT  
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTAGTGTGATG  
AAGGCTTCGGGTCTGAAACACTCTGTTAGGGAGAACAAAGTCTGAGTGAATAAGCTGGCAC  
CTTGACGGTACCTAACCAAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCACCGCGGTAAACGTAGGT  
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAG

**C7 - *Bacillus***

CGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTATAAGACTGGATAACTCGGGAAACGGAGCTAAT  
ACCGGATACGTTCTTCGCATGAGAGAAGATGGAAGACGGTTACGCTGTCACTTATAGATG  
GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTGGTAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC  
TGAGAGGGTAGCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTAGACGAAGAAGGCTTCGGG  
TCGTAAGTCTGTTAGGGAGAACAAAGTACCAAGAGTAACGACTGCTGGTACCTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
GGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACGGCTCA  
ACCGTGGAGGGTCACTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAACAGGAAAGTGAATTCCAAGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACCAGTGGCAAGGCAGTTCTGGTCTGTAAC  
GACACTGAGGCGCGAACAGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA  
CGATGAGTGCTAA

**C8 - *Bacillus***

GCTATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGACTGGTTCTATGACGTTAGCGGGCGACGGGT  
GAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGG  
ATAGGATCTCTCCTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTCGGCTATCACTACAGATGGGCC  
GCGGTGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGATAGCCGACCTGAGA  
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTAGTGTGATGAAGGCTTCGGGTCGTA  
AAACTCTGTTAGGGAGAACAAAGTACGAGAGTAACGACTGCTCGTACCTGACGGTACCTAACCA  
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTATCGGAA  
TTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGGCCACGGCTAACCGT  
GGAGGGTCACTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAACAGGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTTGGTCTGTAACGTGACG  
CTGAGGCGCGAACAGCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
GAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTG  
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCCGGTGGAG  
CATGTGGTTAATCGAAGCAACGCGAAGACCTTACCAAGGTCTGACATCCTGACCAACTCTAGA  
GATAGAAGCGTTCCCTCGGGGACAGAGTGACCGAGGTGGCATGGTGTGTCAGCTC

**C9 - *Bacillus***

GCCTATACATGCAAGTCGAGCGGATCTCATTAGCTGCTTGAAGATCAGCGGGCGACGGGTGA  
GTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT  
AATCCTTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTCGGCTGTCACCTACAGATGGGCC  
GGCGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  
GTGATCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCT

TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGCGATGAAGGCCTCGGGTCGTAAA  
GCTCTGTTGTCAGGAAGAACAAAGTATCGGAGTAACCGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGA  
AAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGTGGCAAGCGTTGCCGAATT  
ATTGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG  
GAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTA

**C10 - *Paenibacillus***

TGCCTAATTACATGCAGTCAGCGGAGTTGATAAGAACGTTGCTTGTAACTTAGCGGCCGAC  
GGGTGAGTAACACCGTAGGCAACCTGCCCTCAAGTTGGGACAACACTACCGGAAACGGTAGCTAATA  
CCGAATAATTGTTTCTCGCCTGAAGGAAACTGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGGGATGG  
GCCTGCGGGCGCATTAGCTAGTGGTAGGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCT  
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGTGAGTGTGAAAGGTTTCGGA  
TCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAAGAACGTTGGGAGAGTAACTGCTCTCAAGGTGACGGTACCT  
GAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACTGCCCTGCAGCCCGGTAAACGTAGGGG

**C13 - *Rhodococcus***

GCTTACCATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTCGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA  
CGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCT  
CCTGTCGATGGCGGGGTTGGAAAGGTTACTGGTGCGAGGATGGGCCGCGCTATCAGCTTGT  
TGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGCGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCAGCCGACACT  
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAAATGGCGA  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAACCTTTCAGCAGG  
GACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAACGCCGAAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
TAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGAATTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTGCGC  
GTCGTCCGTAAAACCTGGGCTAACCCCAAGCTTGCAGGCGATACGGCAGACTGAGTACTG  
CAGGGGAGACTGGAATTCCCTGGTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC  
GAAGGCAGGCTCTGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGTAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCTAGGTGTGGTTTCCTTCACTGGGATCC  
GCGCCG

**C14 - *Rhodococcus***

GCTTACACATGCAGTCAGCGGTAAGGCCCTTCGGGTACACGAGCGAACGGGTGAGTAA  
CACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC  
CAAAGGCTGCATGGCTTTGGAAAGGTTACTGGTGCGAGGATGGGCCGCGCTATCAGCTT  
GTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGCGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTACCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAAATGGCG  
AAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAACCTTTCAGCAG  
GGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGAGAAGAACGCCGAAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGAATTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTGTC  
GCGTCGTCTGTGAAAACCGAGCTCAACTGCTGGCTGCAGGCGATACGGCAGACTGAGTAC  
TGCAGGGGAGACTGGAATTCCCTGGTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG  
GCGAAGGCAGGCTCTGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGTAGCGAACAGGAT  
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGCGTAGGTGTGGTTTCCTCACGGGATCC  
CGTGCC

**C15 - *Bacillus***

GCTATACATGCAAGTCAGCGGACAGAAGGGAGCTTGTCTCCGGATGTTAGCGCGAACGGGTGA  
GTAACACGTGGTAACCTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT  
AGTTCCCTGAACCGCATGGTCAAGGATGAAAGACGGTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGC  
GGCGCATTAGCTAGTGGTGGGTAAATGGCTACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGTGAAAGGTTTCGGATCGTAA  
GCTCTGTTAGGAAAGAACAAAGTGCAGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGA  
AAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGTGGCAAGCGTTGCCGAATT  
ATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCAGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG  
GAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGGAGAGTGGAAATTCCACGTGTAGCGGT  
GATATGCGTAAGAG

**C16 - *Bacillus***

ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCCTCCGGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTA  
ACACGTGGGTAAACCTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGT  
TCCTTGAAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTCCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCCGCGC  
GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAGTGTAGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCT  
CTGTTGTTAGGAAGAACAAAGTGCAGAGTAAC TGCTCGCACCTGACGGTACCTAACAGAAAG  
CCACGG

**C17 - *Sporosarcina***

GCTATACATGCAAGTCGAGCGGAACTAAGGAGCTTGCCTCTAGTTAGCGCGGACGGGTGAGT  
AACACGTGGCAACCTGCCCTGCAGATGGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGAATAA  
TCAGTTGGTCCGCATGGACCGACTCTGAAAGACGGTTCCGGCTGTCACTGCAGGATGGCCCGCG  
CCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAATGCCCTACCAAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT  
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTC  
ACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAAGCGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAAGC  
TCTGTTGTAAGGAAGAACAAAGTACGGGAGTAAC TGCCGTACCTGACGGTACCTTATTAGAAA  
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGTAAACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCCGAATTAT  
TGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTAACCGTGG  
GGTCATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCACGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGAT

**D1 - *Kocuria***

GACGCAGGGTGCTACCATGCAGTCGACGATGAAGCTCCAGCTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAA  
CGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAAT  
ACTGGGATACTACACATTCTCGCATGGGGTGTGAAAGGGTTACTGGTTGGATGGCTCA  
CGGCCTATCAGCTTGTGGGGTAATGCCCTACCAAGGCAGCACGGTAGCCGCTGAGAG  
GGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAT  
ATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGTTGTA  
AACCTTTTCAGCACCGAAGAAGCGAAAGTGCAGGTACGTGCAAAGAAGCGCCGCTAACTACG  
TGCCAGCCCGGTAAACGTAGGGCGCAACCGTTCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTC  
GTAGGCAGTTGTCCGTCTGTTGAAAGCCGGGCTTAACCCGTGGTGTGCAGTGGTACGG  
GCAGACTAGAGTCAGTAGGGGAGACTGGAATTCTGGTAGCGGTGAAGTGCAGATATCAT  
GAGGAACACCGATGGCAAATGCAGGTATCTGGCTTACTGACACTGATGAGCTAACGCCTGG  
CAGCGAACITGATCACATCTATACTGTGCCTACATCAAACGTACAGTTGACTTGTGGATCT  
TCCATGATATTGGTGCATTAGCAAATTCTAAACATTAATCTCTGGATAATTATT

**D2 - *Planococcus***

GCGCAGCGGTGCTACTGCAGTCGAGCGGACACATTGGAGCTTGCCTTGGTTAGCGCGGAA  
CGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCCTGCAGATGGGATAACTCCGGAAACCGGTCTAAT  
ACCGAATAGTTGCCCTCTCATGAGGCTGCAGGAAAGACGGTTCCGGCTGTCACTGCAGGATG  
GGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCCAGATGCGTAGCCGACC  
TGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGA  
TCGTAAAACCTGTTGTAGAGGAAGAACAAAGTACCAAGTAACACTGGTACCTTGACGGTACCTCA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GAATTATTGGCGTAAGCGCGCAGCGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAA  
CCGTGGAGGGTATTGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGAGTGGCGAAGGGCACTTCTGGTCTGTAACG  
ACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
GATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGTGCAAGCTAACGCTTAAGCACTCCGC  
CTGGGAGTACGCCCTCAATGTTGAAACTCAAATTATTGAATGGGGCCGTCTAGCTGTAGGA  
ATATATGGTTAATTCTATACCTCCAAGAATATTTATGTACTTGTATTCTAGTACTCGCTATGT  
ATATTAGGCTTATCTTATGTGT

**D3 - *Microbacterium***

GAAGATGCGGTGCTACCATGCAGTCGACGGTGAAGCAGAGCTTGCCTGTGGATCAGTGGCGAA  
CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAAT

ACTGGATATGAGCTGCGACCGCATGGTCAGCAGTTGAAAGATTTCGGTCTGGGATGGGCTCAC  
GGCCTATCAGCTTGGTGAGGTAAATGGCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGCTGAGAGG  
GTGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAA  
CCTTTAGCAGGGAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGGCCGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCGGAATTATTGGCGTAAGAGCTCGT  
AGCGGTTGCGCTGCTGAAATCCCAGGGCTAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGCA  
GACTAGAGTGCAGTAGGGAGATTGAAATTCCCTGGTAGCCTGGGAATGCGCAGATATCAGGAG  
GAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCGGCCCTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGA  
GCAAACAGGCTTAGATAACCCTGGTAGCCTGGCTAACCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGTCCATT  
CCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGATTAAGTTCCCGCTGGGAGTACGCCCAAGGCTA  
AAACTCAAAGGAATTGACTGGGACCCGCACAAGCGCCGTATCTGCGGATGTATTCTTATGTAT  
CGCTACATACCGTAACAAGGTTGTATTCTACTAAGATGGGCCTATATCTGGATAAGCTGCTA  
TAGCTCTGAGAATGATGTGCTGAGTGTGCTAGTGTGCTCCCCCTGCTCTGTATGGTATG

**D4 - *Micrococcus***

GAACGCTAGCGGTCTACCATGCAGTCAGCAGTGAAAGCCCAGCTGCTGGGTGGATTAGTGGCGA  
ACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA  
TACCGGATAGGAGCGCCTACCGCATGGTGGGTGTTGAAAGATTATCGGTTTGGATGGACTCGC  
GCCCTATCAGCTTGGTGAGGTAAATGGCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAGAGG  
GTGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAA  
CCTTTCACTAGGGAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAACCGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCGGAATTATTGGCGTAAGAGCTCGT  
AGCGGTTGCGCTGCTGCGTAAAGTCCGGGCTAACCCCGATCTGGTGGACTAGGTGTGGGACCAT  
GACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCTGGTAGCCTGGGAATGCGCAGATATCAGGAG  
GAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTGGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGA  
GCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGCCTGGCTAACCGTAAACGTTGGCACTAGGTGTGGGACCAT  
TCCACGGTTCCGCCCGCAGCTAACGATTAAGTCCCCGCTGGGAGTACGCCCAAGGCT  
AAAACCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGCCGGAGCATCGGATTATCGATGCAAC  
GCGAAGAACCTACCAAGGCTGACATGTTCTCGATGCCGTAGAGATAACGTTCCCTTGGGG  
CGGGTTCACAGGTGGATGGTGTCCCTCACCTCGGTGCCGTAAAGTGGGTTAATTCTCGCT  
ATTATCTCAA

**D5 - *Kocuria***

GACGACAGGGTGCTACCATGCAGTCAGCAGTGAAAGCCCAGCTGCTGGGCGGATTAGTGGCGAAC  
GGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA  
CTGGATACTACCTTACCGCATGGTGGGTGGAAAGGGTTTACTGGTTTGGATGGCTCAC  
GCCCTATCAGCTTGGTGAGGTAAATGGCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAGAGG  
GTGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGCACAATGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAA  
CCTTTCACTAGGGAAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAACGCCGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGCTGGGAATTATTGGCGTAAGAGCTCGT  
AGCGGTTGCGCTGCTGCGTAAAGCCGGGCTAACCCGGGCTGCAGTGGGTACGGACT  
CACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTCGAATTCTGGAATTCTCTTAACCTGCAGATCTCATGAGG  
AACACCGATGGTGTACGTACGCTCTGGCTACTACTGACGCTGAGGAGCCAAGCATGTAGAGC  
GAACACGATTATATACTCTGGTAGTTCACTACAGTACGTTGAGTTCTATGTATGGAGATAT  
TTAAGTTATTCTGCTGTATTGTAATCGCAGATTATGTGATCTGCTATG

**D6 - *Kocuria***

GTAGCAGGGCGGTCTACCATGCAGTCAGCAGTGAAAGCTCCAGCTGCTGGGCGGATTAGTGGCG  
AACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTA  
ATACTGGATACTACACATTCTCGCATGGGGGTGTGGAAAGGGTTTACTGGTTTGGATGGCT  
CACGCCCTATCAGCTTGGTGAGGTAAATGCCCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAG  
AGGGTGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGA  
ATATTGACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTG  
TAAACCTCTTCAGCACGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACGTGCAGAAGAACGCCGGCTAACTA  
CGTCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGCTGCCGAATTATTGGCGTAAGAGC  
TCGTAGGGCGTTGCGCTGCTGTGAAAGCCCAGGGCTAACCCGTGGTGCAGTGGGTAC

GGGCAGACTAGAGTCAGTAGGGGAGACTTGAATTCTGGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
ATGAGGAACACCGATGGCGAAGGCATGTCTGGCTGAACCTGACGCTGAGGAGCGATATCCCG  
TGAAGCGAACATGATTCTACTCTGGTACATCATAACGTAAAGATAGGTACCATGAGACGAGC  
ACGATACCGTATTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGAGAGTACGGCCCCAA  
GGCTAAAACCTAGAGTAAATAGACGGTAGTCCCTCTCACTCTAATGGTGTGGGATTAAATTG  
TTGTTGTGGAAGAATCTAATATATTCTACCATTGACGAAA

## D7 - *Bacillus*

GGGCATGGGTGCTATACTCGAGTCAGCGGGATCTCATTAGCTGTTGAAGATCAGCGCCGG  
ACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCAGGAAACCGGAGCTAA  
TACCGGATAATCCTTCCCTCATGAGGGAAAGCTGAAAGACGGTTCCGGCTGTCACCTACAGAT  
GGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCCAAGGCCAGATCGTAGCCGAC  
CTGAGAGGGTATGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAAGCAGTGAAGGCCTCGG  
GTCGTAAGCTCTGTTGTCAGGGAAAGAACAGTACCGGAGTAACGCCGGTACCTTGACGGTACCC  
TGACCAGAAAGCCACGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  
CCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCCGCAGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTC  
AACCGGGGAGGGTCACTGGAAACTGGGAACITGAGTGCAGAAGAGGGAGAGCGGAATTCCACGT  
GTACCGGTGAAC TGCTATAGATGTGGAGGACCACCGTGCCTAAGGTAGCTCTGCTCTGTCAC  
CGACCTTGATGCCATCCATCTTCTGGAATTAAACGAGTTAGAAACGTTGTGCTTCCACCTCCATG  
ACAATGATTACGAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCAGCAAACGCATTAATCACTCC  
GCCTTGGGGATTACGGCCGCAGGGCTGAAACTCAAAGAAATTGTCAGGTGCCCTGCACAAACCT  
GTTTATCTATGTGTGTTAATTCTGATTCTGATTATAAACTGTATCCAAGTTTGCCTCCCT  
GAATATCTATATGAAGTATGTGAGTTCTATCTGTCAGTAAAGCTAAATAGTTGATAGTTGGA  
TTTAGTGTGAACCAGATGGT

D8 - *Bacillus*

GAAAGGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGATTGATGGGAGCTTGTCCCTGATATCAGCGGGGA  
CGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTTCGGAAACCGGAGCTAAT  
ACCGGATAATCCTTTCCCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTCGGCTGTCACTTACAGATG  
GGCCCCGGCGCATTAGCTAGTGTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGATGCGTAGCCGACC  
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTAGCGATGAAGGCCTTCGGG  
TCGTAAGCTCTGTTAGGAAGAACAAAGTATCGGAGTAACGCCGTACCTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCCAGGCCGTCTTAACTGATGTGAAAGGCCACGGCTCA  
ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGATTCCACGTGT  
ACCGGTGAACCTGAGTATAGATGTGGAGGAACATCACTGCCGAACCTCCGGTCTGCCCT  
GCCGCTGAAGTGCCTAACCTGCCGATCTACAGAAGATGAGACAGGGTAGTCAGAACCCATCTG  
GAGATGTGTGAGTGGCGTAGCAAGGTTCTGCCCTTGTGGCTGCAGCAATTAAATTAGAAG  
TCGGACGGGGAGAAGGGTGCAGTCTGGAAGTAAGTGGTATTGTGTAGTGGTCGAATAGTG  
TGTTGTGTGTGGTGGTGGAAAG

## D9 - *Microbacterium*

GTAGCAGCGGTCTACCATGCACTCGACGGTGACACGGAGCTTGCCTGTGGGATCAGTGGCGAA  
CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAAT  
ACTGGATATGTGACGTACCAGCATGGTCTGCGTCTGAAAGAAATTCCGGTGGGGATGGGCTCGCG  
GCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGTAGCCGGCTGAGAGGG  
TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATT  
GCACAATGGGCCAAGCCTGATGCAAGCAACGCCGCGTGGGGACGACGCCCTCGGGTTGAAAC  
CTCTTTAGCAGGGAAGAACGAAAGTGCACGGTACCTGCAGAAAAAGGCCGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTA  
GGCGGTTGTCGCGTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGAGTGGGTACGGCAG  
ACTAGAGTGCCTAGGGGAGATTGAAATTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGG  
AACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAAC TGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGAG  
CAAACAGGCTTAGATACCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGAACTAGTTGTGGGTCCATT  
CACGGATTCCGTGACGCAAGCTAACGCTTAAGTCCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAA  
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACGC

GAAGAACTTTACAATGGATTGATATACGAGAGACGGGCCAGACATGGTCATCTCTTTGAAATA  
TGTAAATGTGGTGGTGGTATGTTGTCGATATGTG

**D10 - *Microbacterium***

GTAGCAGCGGTGCTACCATGCAGTCGACGGTGACACGGAGCTTGCCTGTGGGATCAGTGGCGAA  
CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCAAT  
ACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTCGTGGAAAGAATTCCGGTTGGGATGGCTCGCG  
GCCTATCAGCTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGTCACGGTAGCCGGCTGAGAGGG  
TGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTATT  
GCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGGAGGGACGACGGCCTCGGGTTGAAAC  
CTCTTTAGCAGGGAAGAACGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGCTAACTACGTG  
CAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTA  
GGCGGTTGCGCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTCACACCTCCGGCCTGCAGTGGGACGGGAG  
ACTAGAGTGCAGTGGGAGATTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCAGATATCAGGAGG  
AACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGAG  
CAAACAGGCTTAGATAACCTGGTAGTCCACCCGTAACCGTTGGGAAACTAGTTGTGGGTCATT  
CACGGATTCCGTACGCTAACGCAATTGACGGGACCCGACAAGCGCGGAGCATCGGATTAAATCG  
AACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAGCGCGGAGCATCGGATTAAATCGATGCAACGC  
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATCCGAGAACGGGCCAGAAATGGACAACTCTTGGACACT  
CGGAATCAGGTGGTGGTGTGCTGAGCTCGTGTCTTG

**D11 - *Rothia***

GGAGGAAGCGGTGCTTACACATGCAGTCGAAACGATGAAAGCCCAGCTTGCCTGGGTTGATTAGTG  
GCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCTTAACCTCTGGGATAAGCCTGGAAACGAGGT  
CTAATACCGATACGACTAGTCCCGCATGGGATGCTGGTGGAAAGGGATATGTAACGGTTTTAGA  
TGGGCTACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGTAGCCGG  
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGGATGACGGCCTTCG  
GGTTGAAACCTCTTCACCAGGGAAAGCGAAAGTACGGGACTCTGCAGAAGAATGCCGCTCA  
CTACGTCCAACGGAGCGTTACGTAGGGCGGAGCGTTCTCCGGATTATTGGCCTGAAGA  
GCTTGTGGCGCTATGTGGAGTCTGCTGCTGGAAATTATTGCATTGTGTCTCCCCGGGAT  
ACCCCATCTACTACTGCCTGGGGACAGCCCCTCCACTCACTGACTATCTATTCCACCTACCA  
TGCCAACGTTCAGACTCTGCCTAACCTGTCTATTCTAGCATCCCTCAAGCTTGTGCGTGGCG  
ACCTACGTGCATCTCAATGCTTCTAGATAGTATGACAAGATGACATAAAATATCGGAATGTGTA  
AGTGGTGTGCTAGTGGTGAAGCTTATAATTGGGTGAGTTGATAGATCTACAGATGATT

**D12 - *Microbacterium***

GTAGACATGGCGCGTCTTAACCATGCAAGTCGAAACGGTGAAAGCGGAGCTTGCCTGCTGGGATC  
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACG  
GCGCTAAATACCGATACGAGCTGCGAAGGCATCTCAGCAGCTGGAAAGAAACTCCGGTCAAGGA  
TGAGCTCGCGGACTATCAGCTTGTGGTGGTAACGGCTCACCAAGGCGTCACGGGAGCCGG  
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGGAGGGACGACGGCCTTCG  
GGTTGAAACCTCTTCTAGCAGGGAAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAA  
AGAGCTCGAAGGTGGTCTGCGCGCTGCTGTGAAACCTGGACGCTCAAGATTGAATCGTGGCTGC  
CTCCGGTAAGAATGCACTCCTCTCGCCAGAGCAGACTACCCCATCCCTCACGTGACAATCCT  
CCGTTCACTCCTCACCATGCCATTGCGCTCAGACCCGTAGCCTAGCTCAAGCCCATTCTAGGCCTC  
CCATAAAAACAAGCTTGTGCCGTCCACCGTACCTTAAGCCGAGATCTCAACGCTACTACCTTAG  
ATCTAGTATAAACACGAGTATGACTTGTACGATCTACGGTACATGGATGGTGAAGAGATGAGT  
TGCAGTACTCCCACAAATAAGATAACTTAGACAGAGTATATTATGTATATGTCAATAT  
ATGAGTGATAAAAGAGTACTACTTCTATACGCTAGGTGCATATCGAGCTAGAAATGTCGACAGGTT  
GTGATTAATAG

**D13 - *Rhodococcus***

GGGCAATCGGGCGTCTTACCATGCAAGTCGAGCGGTAAAGGCCCTTCGGGGTACAGAGCGGCGA  
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCTGGAAACTGGGTCAAT  
ACCGGATATGACCACAGCATGCATGTGTTGTGGTGGAAAGATTATCGGTGTGAGATGGGCCG  
GGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGTAGCCGACCTGAGAGG

GTGACCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGCACAATGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGAAGGCCTCGGGTTGAAA  
CCTCTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGTAACACGTG  
CCAGCAGCCGCGTAATACGTACGGTGCAGCGTTGTCAGGAAATTACTGGCGTAATGAGTCT  
AAGGTGGTTTGTGCGTCGTTGGTAAAATTGCGTTGTCATTTCACTGTTGTAATGTGATCCGG  
CAGGATTGCCTGTTTCACTGATACGACATCGTTCATCACCGGGTATGAGTGTGTTATCAT  
TGGGTATTACTCTTTACGCCGAATCAGCGAACAGCCGATCTATTCTAACATATAACAGTCTCT  
CTTACCCGGCTAGATTGAGAAAATGACGCATTGCCCTCCCAATTATTAGTAACATGTGGGT  
ACAATAATGTCTCCTGAACATCATGTCAAGTGATAGATAACAAAGAGGGCGTT

**D14 - *Rothia***

GAGGAAGCGGTGCTTACACATGCAAGTCGAACGATGAAAGCCAGCTGCTGGGTGGATTAGTGGC  
GAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCTTAACCTGGGATAAGCCTGGAAACGAGGTCT  
AATACCGGATACGACTAGTCCCGATGGGATGCTGGTGGAAAGGGATATGACTGTTTAGATG  
GGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAACGGCTACCAAGGCAGCACGGTAGCCGCC  
TGAGAGGGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGACACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG  
GTTAACCTCTTCAGCAGGAAGAACGAAAGTACGCGCTGCAGAAGAACGCCGCTCGTACTG  
CCACAACCGCCTAATACAATGGGCCAGCGTTGCCAGACCAGTGAGCGTAAGTACATCTGCC  
GCAGAACCGTCAGTTTATTCCCTGGCGCAATTCAATATTGAGTCTATCGAGCTAGACTCATG  
CTCTAGGGGACAGGCATATCCTCCCATACTCAATTGTTCACTGAGCTACATCTCATGCGTAAGCT  
CCGACACTGGCTAGCTACTTACCCCTAACTCACGTCAAGAGTGCTATCATCTACCTTAACCAAT  
GCATCTCATACTCATGAGATAATAGAGATTGTTCTTACTTCTGTAGAGAACGACTCG  
AGATGTAGCAGGATCGTGGATTGGTACATACTGTTAGTACACTTTAT

**D15 - *Microbacterium***

GAGGCAGGGCGGTGCTAACATGCAAGTCGAAACGGTGAAAGCGGAGCTTGCTCTGCTGGATCAGTGG  
CGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTC  
TAATACCGGATACGAGCTGCGAAGGCATCTCAGCAGCTGGAAAGAACCTCGGTCAAGGATGAGC  
TCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAACGGCTACCAAGGCCTGACGGTAGCCGGCTGA  
GAGGGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGACACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTT  
GTAAACCTCTTCTAGCAGGGAAAGAACGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTCCGGATTATTGGCGTAAAGTG  
CTCGTAGCGCATTGGCGCTCTGTTGCTTCACTGGAGGGCTCTCATCTAGTCTGCCCTGGGATC  
GCGCGGACTAGAGTGCAGCCGAGAGATCGAAATCCCTGCTGATTATCTGATTTCGGTTATTTC  
TCTTGTCCGCTTTGGTTATTCTTCGATGGTCACTCACCTACTCTTATATCGTAATATCGCTCAA  
AGCTGTCTATGCTCTAGATTATATTGTTGATATTGTGGGATGTGTTAG

**D17 - *Microbacterium***

GAGGAGCGGTGCTACCATGCAAGTCGACGGTACACGGAGCTGCTCTGTTGGGATCAGTGGGAAC  
GGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATA  
CTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGCGTCTGGAAAGAACCTCGGTGGGGATGGGCTCGCG  
CCTATCAGCTTGTGGTGGTAATGGCTACCAAGGCCTGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGT  
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG  
ACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGTGAGGGACGACGGCCTCGGGTTGAAACC  
TCTTTAGCAGGGAAAGAACGAAAGTGACGGTACCTGCTATAAACGCCGGTTGATACGGCCAGATG  
CGCCGTCTACGATTGTTCATGCTGCTCCGGATTATATCCGTTGGAATTCTGTCGGAAAACGCC  
CTACTACCTTGCTCGTCGTCAGCAATATCTAATATCTGAATCCAGATTGAGTGGCTATTGG  
GGGAGGGTGTCTCACCAAGGAAATTCTTACTCCGCAATGTTCTATGAGTCGATTGAGATGATCAT  
TCCCGTGTATTCTATTGATTGTATCGTCACTTATCTAATGTATTCTATGCTTATCTATATAA  
ATAGTTGTTTTTATTGTTATT

**D18 - *Microbacterium***

GATGAGATGGCGGTGCTTAACCATGCAAGTCGAACGGTGAAAAGAGAGCTGCTCTGGATCAG  
TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGAC  
GTCTAATACCGGATACGAGCTGCGACCGCATGGTCAGTAGCTGGAAAGAACCTCGGTAGGGATG  
AGCTCGCCGCTATCAGCTAGTTGGTGGTAATGGCTACCAAGGCCTGACGGTAGCCGCC  
TGAGAGGGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG

GGGAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGACGACGGCCTTCGG  
GTTGTAAACCTCTTTAGCAAGGAAGAACGAAAGCTGACGGTACTTGCAGAAAAAGCGCCGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAACCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAA  
GAGCTCGTAGGCGGTTGCGCTCTGTCATCCGAAGCTCAATCTCAGGTCTGCAGTGGG  
TACGGGCACACTAGAGTCGGTAGGGGAGATTGCAATTCTGTTAGCCGTGAATGTGAGATT  
TCATTGAGGTACCCATTATGGTTAGGCTATATATTAACTAACATTGATCTTTATACAG  
CTTAAATGGTTGTTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGT  
AGTGTGAGAGTATTAGTCTCGAGATGGATCTATTAGT

**E1 - *Bacillus***

GCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTGCTCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTG  
AGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGA  
TAGTCCTGAACCGCATGGTCAAGGATGAAAGACGGTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCG  
CGCGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAGGATGCGTAGCCGACCTGAGAG  
GGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATC  
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAA  
AGCTCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTGAAGAGTAACTGCTGCACCTTGACGGTACCTAACCAAG  
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCATAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGAAT  
TATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC

**E2 - *Macrococcus***

GCTATACATGCAAGTCGAGCGAATTGACAGAGGTGCTTGCACCTCTGATTTAGCGGCGGACGG  
GTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAATATTAGCTCGCATGAAGCAATAGTGAAGACGGTTCTGCTGTCACCTATAGATGGACC  
TGCCTGTATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCACGATACAGCCGACCTGAG  
AGGGTAGTCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGGTGAGTAAGAAGGTTTCGGATCG  
TAAAACCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTACGTTAGTAACTAACGTAACCTTGACGGTACCTTAC  
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGTAAGCGTTATCCGA  
ATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGGCTCTTAAGTGTATGTGAAAGCCCCGGCTAACCC

**E4 - *Bacillus***

TACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA  
CACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTT  
GTTGAACCGCATGGTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCAACTACAGATGGACCCGCGC  
GCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGGTGATGAAGGTTTCGGATCGTACAGCT  
CTGTTGTTAGGGAAAGACTATCTCGTT

**E5 - *Oceanobacillus***

GCTATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCAAGCTGATCCCCTCGGGGTGACGCTTGTGGAATG  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACCCGGAAAC  
GGGGCTAATACCGGATAATACTTCTTGCATAAAGGAAAGTTGAAAGGGCGCTCGGCTGTCAC  
TTACAGATGGCCCGCGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCACGATGCG  
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGGTGATGAAG  
GTTTCGGATCGTAAACTCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTGGTAGTAACTGACCCAACCTGA  
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGAA  
GGTTGTCCGAATTATGGCGTAAAGCGCTCGCAGGGCTTAAAGTGTATGTGAAATCTC  
GGGCTCAACCGCAACGGTATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATT  
CCACGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAA

**E6 - *Microbacterium***

GGAATGGCGCTGCTTACCATGCAAGTCGACGGTAACACGGAGCTGCTCTGTGGATCAGTGGCG  
AACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCGCTGAAACGGCGCTA  
ATACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGGCTGGAAAGAACGGGTTGGGGATGGGCTCG  
CGGCCTATCAGCTGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCCTGACGGGTAGCCGGCTGAGAG  
GGTAGCCGGCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAT

ATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGACGACGGCCTCGGGTTGTA  
AACCTTTTAGCAGGAAAGAAGCAGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCAGCCGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTC  
GTAGGCAGTTGTCGCGTCTGTTGAAATCCGGAGGCTCAACCTCCGGCCTGCAGTGGGTACGGG  
CAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGATTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATACTCAGG  
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCGTAACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGG  
GAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGAAACTACTTGTGGGTCC  
ATTCCACGGATTCCGTACGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGAGCACAGCCGAAGG  
CTAAAACCAAAGGACTTGACCGGGACACGCACAAGCGGATTAGCGTGTGATCCATTGATGCT  
TCGCTCAGCACCCCTCCGCGGGCTTGACATATAACGACGAACGTGACTCAAATGGATCAATTCTT  
TGTACTCTCTAACACGGTGGTGCATGGTTGTCCTCAGTTCATGTC

**E7 - *Microbacterium***

GTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCGC  
TGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTCGTCTGGAAAGAATTTCGG  
TTGGGATGGCTCGCGCCTATCAGCTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCGTCACGGGT  
AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTGGGAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGAGCAG  
GCCTCGGGTTGAAACCTCTTGTAGCAGGAAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAGC  
GCCGCTAACTACGTGCCAGCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGAATTATTG  
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTGCGCTCTGTTGAAATCCGGAGGCTAACCTCCGGCCT  
GCAGTGGGTACGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGAGATTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGGAAT  
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCGTAACGACGCTGAG

**E8 - *Microbacterium***

GCTTACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCAGAGCTGCTCTGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAG  
AAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATA  
TGAGCTCGACCGCATGGTCAGCAGTGGAAAGATTTCGGTCTGGATGGCTCACGGCCTATCAGC  
AGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTACCGG  
CCACACTGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACTAA  
GCTCGAAACCTGACGCTACAACACCGCGTGAACGTGGCCTGACTTCACTATTATA

**E9 - *Arthrobacter***

GCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAACCTCACTTGTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTA  
CACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCGCTGGAAACCGGGTCTAATACTGGATAACGA  
CCTTCCCAGCGCATGGGTGTTGGTGGAAAGCTTTGTGGTTTGGATGGACTCGCGCCCTATCAGC  
TTGTTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTACCGG  
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAATGG  
CGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTAGGGATGAAGGCTTGGGTGAAACCTCTTCAGT  
AGGGAGAAGCTGATTCTTTGGGGTTGGTAGCGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCT  
CGTAGGGCGTTGCGCTGCGTGAAGTCCGGCTTAACCTCCCGATCCTCGGGTGGGT

**E10 - *Bacillus***

GCTATACATGCAAGTCGAGCGAACCTTGGAGCTTGCTCCCATTGGTTAGCGCGGACGGGTGAG  
TAACACGTGGCAACCTGCCCTGTAAGACTGGATAACTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA  
ATCTTTTCTCATGAGGAAAATTGAAAGTCGGTTTCGGCTGACACTTACAGATGGCCCGCG  
GGCATTAGCTAGTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG  
TGATCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTT  
CCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTAGCGATGAAGGACTTCGGGTGTAAG  
CTCTGTTGTTAGGGAGAACAAAGTACCGGAGTAACGCGTACCTGACGGTACCTAACAGAA  
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGCGGCAAGTGTGTCGGAAATTA  
TTGGCGTAAAGCGTGCAGCAG

**F1 - *Macrococcus***

GCACTCCTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGGA  
TAACCTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCACCTCATGGTGGAAATAGTGAAGA  
CGGTTCTGCTGTCACCTATAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTCACC  
AAGGCAGCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTACGCCACACTGGACTGAGACACGGCCA

GAATCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC  
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGAAAGAACAAAGTACGTTAGTA  
ACTGAACGTACCTTACGGTACCTTACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACTAGGTGGCAAGCGTTATCGGAATTATTGGGCTAAAGCGCGTAGGCAGGGTTCTAA  
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCAGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAAATTCCATGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGG  
CGAAGGCGGCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC

**F2 - *Micrococcus***

CTGCCCTGACTCTGGATAAGCCTGGAAACTGGGCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCAT  
GGTGGGTGCTGGAAAGAATTTCGGTCATGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGGTGGTAGGTA  
TGGCTACCAAGGCAGCAGCGGTAGCCGGCTGAGAGGGTAGCCGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGACAATGGGCAAAGCCTGATGCA  
GCGACGCCGCGTGGAGGATGACGGCCTCGGGTTGTAACCTCTTCAGTAGGGAAAGAAGCGAAA  
GTGACGGTACCTGAGAAGAACGACCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGT  
GCGAGCGTTATCGGAATTATTGGGCTAAAGAGCTCGTAGGCAGGGTACGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGG  
GTCCGGGCTTAACCCGGATCTCGGTGGTACGGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCAAGGCAGGTCTC  
TGGGCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGT  
CCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTCCACGGTTCCCGCGCCAGCTAACGC  
ATTAAGTCCCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTAAAA

**F3 - *Micrococcus***

CTCTGGGATAAGCCTGGAAACTGGGCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGTGC  
TGGAAAGAATTTCGGTCATGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGGTGGTAGGTAATGGCTCAC  
AAAGGCACGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGTAGCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCGACAATGGGCAAAGCCTGATGCAAGCAGCC  
GCGTAGGGATGACGGCCTCGGGTTGTAACCTCTTCAGTAGGGAAAGAAGCGAAAGTGCAGGT  
ACCTGCAGAAGAACGACCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGT  
TATCCGAATTATTGGGCTAAAGAGCTCGTAGGCAGGGTTGTCACGTCTGCGTAAAGTCCGGG  
CTTAACCCGGATCTCGGTGGTACGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCTG  
GTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCAAGGCAGGTCTCTGGGCTGT  
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGCCG  
TAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTCCACGGTTCCCGCGCCAGCTAACGCTAAAGTG  
CCCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGC  
GGCGAGCATGCGGATTAA

**F4 - *Macrocooccus***

CTATAAGACTGGGATAACTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTCACCTCATGGT  
GAATAGTGAAGACGGTTCTGCTGTCACTTAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAG  
GTAACGGCTACCAAGGCAGCAGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCCGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTTGTAAGGGAAAGAAC  
AGTACGTTAGTAACGACGTTACCTGACGGTACCTTACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTACCTGAGAGGGTAGCCGCCACACTGGGACTG  
GGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGAGGGTCAATTGGGAAACTGGGAGA  
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCATGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGA  
ACACCAAGTGGCAAGGCAGGCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGATCA  
AACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC

**F5 - *Macrocooccus***

ACCTATAAGACTGGGATAACTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTCACCTCATGG  
TGGAAATAGTGAAGACGGTTCTGCTGTCACTTAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAG  
AGGTAAACGGCTACCAAGGCAGCAGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCCGCCACACTGGGACTG  
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAACCTCTGTTGTAAGGGAAAGAAC  
CAAGTACGTTAGTAACGACGTTACCTGACGGTACCTTACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTACCTGGGAAATTATTGGGCTAACGCGCGTA  
GGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGAGGGTCAATTGGGAAACTGGGAGA

GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAT  
CAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG

**F6 - *Micrococcus***

ACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCG  
CATGGTGGGTGCTGGAAAGAATTTCGGTCATGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGGTGAGG  
TAATGGCTCACCAAGGCACGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGTAGACCGGCCACACTGGACTGA  
GACACGGCCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTGAT  
GCAGCGACGCCGCGTAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGAAACCTTTCACTAGTAGGGAAAGAACG  
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAACGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAG  
GGTGCAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCAGGTTGTCACGTCTGCGT  
AAAGTCCGGGCTTAACCCGGATCTCGGTGGTACGGCAGACTAGAGTCAGTAGGGAGAC  
TCCAATTCTGGTAGCGGTGGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGT  
CTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGT  
AGTCCATGCCGTAAACGTTGGCACTAGGTGTGGGACCATTCCACGGTTCCCGCGCC

**F7 - *Macrocooccus***

GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGGAG  
CTAATACCGATAATATTTCACCTCATGGTGAATAGTGAAGAGCGGTTCTGCTGTCACTTATA  
GATGGACCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTACCAAGGCACGATGCGTAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTT  
CGGATCGTAAAAGTCTGTTGAAGGGAAGAACAAAGTACGTTAGTAACGTACCTGACGGT  
ACCTTACCAAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCAGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAGACCCCCGG  
CTCAACCGGGAGGGTCATTGAAACTGGAGACTTGAGTGCAAGAGGGAGGTGGAATTCCAT  
GTGTAGCGGTAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCAAGGCCGCTCTGGTCTGT  
AACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG

**F8 - *Macrocooccus***

GACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGG  
GAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCACCTCATGGTGAATAGTGAAGAGCGGTTCTGCT  
GTCACTTAGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTACCAAGGCACG  
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGT  
AAGAAGGTTTCGGATCGTAAAAGTCTGTTGAAGGGAAGAACAAAGTACGTTAGTAACGTAG  
ACCTGACGGTACCTTACCAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCAGGTTCTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCCGGCTAACCG

**F9 - *Micrococcus***

CACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGA  
GCGTCCACCGCATGGTGGGTGCTGGAAAGAATTTCGGTCATGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTT  
GTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCACGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGTAGACGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCG  
AAAGCCTGATGCGACGCCGCGTAGGGATGACGGCCTCGGGTTGAAACCTTTCACTAG  
GGAAGAACGAAAGTGCAGGGTACCTGCAGAAGAACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG  
GTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCAGGTTGTCA  
CGTCTGCGTAGGAAAGTCCGGGCTTAACCCGGATCTCGGTGGTACGGCAGACTAGAGTGCA  
GTAGGGAGACTGGAATTCTGGTAGCGGTGGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGG  
CGAAGGCAGGTCTGGCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATT  
AGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTCCACGGTTCCG  
CGCC

**F10 - *Staphylococcus***

GAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGAAACCGGGCTAATGCCGG  
ATAACATGTTGAACCGCATGGTCTACAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACCTATAGATGGACCCG  
GCCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGCACGATACGTAGCCGACCTGAGAG  
GGTGTAGGCCACACTGGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATC

TTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTCTCGGATCGTAA  
AGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTGTAAGTAACGTGACATCTGACGGTACCTAACAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTACCGGAATT  
ATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTAACCGTGG  
AGGGTCATTGAAACTGGAAAACCTGAGTGAGCAGAAGAGGAAAGTGGATTCCATGTGTAGCGGTG  
AAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCTTCTGGTCTGCAACTGACGCTG  
ATGTGCAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGAG  
TG

**F11 - *Staphylococcus***

TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGATAACTTCGGGAAAC  
CGGAGCTAATACCGGATAAGATTGAAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGCCTGCTGTCAC  
TTATAGATGGATCCCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTAGGAAACTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGTGAAAG  
GTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAACAAACGTGTAAGTAACGTGACGTCTGA  
CGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAA  
GCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAAACCTGAGTGAGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATT  
CC

**F12 - *Macroccoccus***

TGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGATAACTTCGGAAACCGGAGCTAATACCG  
GATAATATTTCACCTCATGGTGAATAGTGAAAGACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCC  
GCGGCCTAGCTAGTTGGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA  
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTA  
AAACTCTGTTGAAGGAAAGAACAAAGTACGTTAGTAACGTGAAACGTACCTGACGGTACCTTACCA  
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAA  
TTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTAACCGG  
GGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGAGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCTCTGGTCTGTAACTGACGC  
TGAGGTGCAAAGCGTGG

**F13 - *Macroccoccus***

TACCTATAAGACTGGATAACTTCGGAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCACCTCATG  
GTGGAATAGTGAAAGACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGACACTGGG  
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAACTTCCGCAATGGACGAAAGTC  
TGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGAAGGAAAG  
ACAAGTACGTTAGTAACGTGAAACGTACCTGACGGTACCTTACCAAGAACCGCACGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCG  
TAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTATTGAAAACCTGG  
GAGACTTGAGTGAGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG  
ATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGGGGT  
TTCCGCCCCCTAGTGTGAGCTAACGCATTAA

**F14 - *Staphylococcus***

GGGAAACCGGGCTAATGCCGATAACATGTTGAAACGCCATGGTTCTACAGTGAAAGACGGTCTT  
GCTGTCACCTATAGATGGACCCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGGGA  
CGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGAACTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTAG  
TGATGAAGGTCTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACGTGCA  
CATCTGACGGTACCTAACAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAAGCTGGAAAACCTGAGTGAGCAGAAGAGGAA  
AGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGC  
GCTTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTG  
GTAGTCCACGCCGAAACGATGAGTGCT

**F15 - *Pseudomonas***

TGGGGGACAACGTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGTGGGGATC  
TTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCA  
AGGCGACGATCCGTAACCTGGCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGGCCATGCCGC  
GTGTGTGAAGAAGGCCCTGGTCGTAAGCAGCTTAAGTTGGAGGAAGGGCTTACAGCGAATA  
CCTGTGAGTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCCGGTAAAT  
ACGAAGGGTGAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGCTTACAGCGAATAAGTT  
GGATGTGAATCCCCGGCTAACCTGGAACTGCATCCAAAAGTCTGGCTAGAGTGCAGGTAG  
AGGGTAGTGGAAATTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGAAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACTACCTGGACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGA

**F16 - *Macrococcus***

CTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCCACCTCATGGTGGAAATAGTGAAAGACGG  
TTCTGCTGTCACTTAGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAG  
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGT  
GAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAAAGTCTGTTGTAAGGGAAAGAACAAAGTACGTTAGTAAC  
AACGTACCTTGACGGTACCTTACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATA  
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCGGAATTATGGCGTAAAGCGCGTAGGGCTTCTTAAGTCTG  
ATGTGAAAGCCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAACAG  
GAGAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GGCGCTCTGGTCTGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG

Priloga C: Nukleotidna zaporedja za identifikacijo izolatov, izoliranih iz kože psov po terapiji. Pred zaporedjem sta navedena delovna oznaka izolata in ime identificirane kulture.

**1BA - *Acinetobacter***

GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAA  
TACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTGCGCTAATAGATGAGCCTAA  
GTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCCTCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGG  
ATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGGACAATGGGGGAACCCT

**2BA - *Acinetobacter***

ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAAT  
ACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTGCGCTAATAGATGAGCCTAAG  
TCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGG  
TGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATT  
GGACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTG

**3BA - *Acinetobacter* (slaba sekvenca)**

TTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAATACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGG  
GACCTCGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCT  
ACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGA

**4BA - *Acinetobacter* (slaba sekvenca)**

AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAATACCGCATT  
ACGTCCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATT  
AGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACTATCTGTATCGGGTC

**5BA - *Acinetobacter* (slaba sekvenca)**

ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAAT  
ACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAG  
TCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGG  
TGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA

**6BA - *Acinetobacter* (slaba sekvenca)**

AATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAATACCGCATACTG  
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGC  
TAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAGGCGACTATCTGTAG

**8BA - *Acinetobacter***

GGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAATACC  
GCATACGTCCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCG  
GATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGA  
TCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA  
CAATGGGGGAACCTGATCCAGCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCCTTTGGTTAAAGCAC  
TTAACGAGGAGGAGGACTACCGAGAGATTAACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAG  
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAG

**9BA - *Pseudomonas* (zelo slaba sekvenca)**

**10BA - *Pseudomonas* (slaba sekvenca)**

GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTCGAAAGGAACGCTAATAC  
CGCATACTGCCTACG

**11BA - *Pseudomonas* (zelo slaba sekvenca)**

GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTCGAAAGGAACGCTAA  
TACCGCATACTGCCT

**CA - *Mycobacterium***

GAAAGGGGTGCTACACATGCAGTCGACGGAAAAGGCCCTCGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGT  
GAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTGGATAAGCCTGGAAACTGGGTCTAATACCGA  
ATACACCTCATGACTGCATGGTGGGGAAAGCTTGCCTGGTAGGGATGGGCCGCGGCCT  
ATCAGCTTGTGGTGGAGGTTACGGCTCACCAAGGCAGCGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAC  
CGGCCACACTGGGACTGAGATAACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAC  
AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAACTCCT  
TTCAGCACAGACGAAGCGCAAGTGACGGTATGTGCAGAAGAAGGACCGCCAACATACGTGCCAGC  
AGCCCGGTAATACGTAGGGCCGAGCGTTGCCGAATTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTG  
GTTTGTGCGTTGTCGTGAAAACCTACAGCTTAACACTGTGGCGTGCAGGCGATACGGCAGACTT  
GAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCCTGGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA  
GCGGTGGCGAAGCGGTGCTCTGGTCACTGACGCTGAAGATCGAAATCGTGCCGTACCCA  
ACCAGATTAGATAACCCGCTATGCCGACCTAAAACAATATGACATAGGTGTCGTAAGCCTTCTT  
GAGAGTGGTAAGTACGTAACACATTAATTAAAATAATTGGGGATTAATTATAATTAAAATT  
AATTATATTGATTATTGTCTTATATAATATAATATTGATTAAATTCTGATTAAAGATATA  
TATAATTATTATT

**1CA - *Rothia***

GAACAGGGGTGCTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGTGGGATTAGTGGCGAACGG  
GTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTGGATAAGCCTGGAAACGAGGTCTAATACCG  
GATACGACTAGTCCCGCATGGATGCTGGGAAAGGGATATGACTGGTTTAGATGGCCTCAC  
GGCCTATCAGCTTGTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCAGCGGTAGCCGGCTGAGAGG  
GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT  
TGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAA  
CCTCTTCACAGGGAAGAACGAAAGTGCAGGCCCTGAGAACACGCCGCTAACTACGTGCCAA  
ACCCCGGTAATACATAGGGCGAGCGTTCCCGAATTATTGGGAGTATCAGAGCTGTCGGCT  
CTATGTCAGTCTGCTGACACAGCCTGGATTAACTCAGCTTGCACGGGACGGCTCCCTTC  
ATTGACTAGGAGATAGAGCAATCCCTGTCAGTGCAGTACAGATCTACATACCATGACAATCAC  
TCATACACTAGCTCACGCTGCTCATGTACACTAACACTAACGCTGCTCCCTGATCTACCTGA  
GTGACATCGCTATCCTGACTTACATGAGTAAAAATGTTGAACCTAGACACTGACACTCGAGT  
AAGAAGTGTGCGAAAAATAAAAAGATTAATTAGTATCATTCCACCTGAAATTACTGGTTTT  
ATCCGTTTCTATTGITA

**2CA - *Agromyces***

GGGAGGGGTGCTACCATGCAGTCGACGATGAACCGGGTCTGCACCTGGGATTAGTGGCGAAC  
GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGGACTCTGGATAACCCGAGAAATCGGAGCTAATA  
CCGGATAGGACCTGGAACCGCATGGTTGGGAAAGTTTTCTGGCTGGGATGGACTCGCGG  
CCTATCAGCTTGTGGTAGGTAATGGCTCACCAAGGCCTGAGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT  
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG  
ACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGTAACC  
TCTTTAGAGGAAGAAGGGCTCGGCTGAGGGTACCTGCAGAAAAGCAGGCCGTAACCTACG  
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAGCGTTGCCGAATTATTGGCGTAAGAGCTC  
GTAGGCCTTGTACGCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCACCTCGGGCTGAGTGGGTACGGG  
CAGACTGGAGTGCCTGAGGGAGATTGAAATTCTGGTAGCGGTGAGGAGTACGCCGCAAGGC  
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTGGCCGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG  
GAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCATAACGTTGGCGTAGATGTGGGACC  
ATTCCACGGTTCCGTGCTGAGCTAACGCTTAAGGCCCGCTGGGAGTACGCCGCAAGGC  
TAAAACCAAAGGACTTGACGGGGGCCGACAATGTGGCGAGCATGCCGATTAAATTCCGATGC  
AACCGAAGAATATTACCAAGGCTGACTTACGATAACCGCTCATAATGGGAAGTTATAT  
GGACATATGTTATCCGGTGTGATAGATTCCGCAAGTTCTAGCTCG

**3CA - *Staphylococcus***

GGGGATGCCGGCGCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAACGCTTGTCTGATGTT  
AGCGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCGGGAAACC  
GGAGCTAATACCGATAATATTGAAACCGCATGGTCAAAAGTGAAGACCGGTCTGCTGTCACT  
TATAGATGGATCCCGCCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCAT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTAGGAAACTCTCCGCAAAGGGCGAACGCCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAG  
GTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACGTGACATCTGA  
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAA

GGCTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTAACCGTGGAGGGTCACTGGAAACTTGAGTCAGAAGAAAGAAAGTGCATT  
CCATGTGTAGCGACGCAATCGCTCCGAGATGTGGAGCAACCAAACGTGAGTATTGTGACCTTTGCT  
CTGATGTTGATTATTATGTTCAAATGCCAGGCTATCAAATATGATGAAGGTCGAGGTTGGCCTC  
GCAGTACACGAGTGAGGAGAAGGGTAGGGGTTCTCCTCCTTA

**4CA - *Staphylococcus***

GGGCATGGCGCGTGTCTACATGCAGTCAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTGACGTTAG  
CGCGGACGGGTAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGAAACCGG  
GGCTAATGCCGGATAACATGTTGAACCGCATGGTCTACAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACCTA  
TAGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATACGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAG  
CAGTAGGAAATCTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTC  
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTGAAGTAACGTCACATCTGACGG  
TACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCAAGCG  
TTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG  
GCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAACTGGAAAACCTGAGTGCGGAAGAGGAAAGAGGAATTCA  
TGTGTAGCGGTGAAATGCGCACAGATTGCGAGAACACCAGTGGCTGAAGGCAGTTGGCTG  
CAACTTGACGCTTGAGTGCAGACGGATTAGACAGGATTATTACCTTGTCACTCCCCGCC  
GAAAACGATGAGTGCTAATTGTTAGGGGTTCCGCCCTTGTTGAGCTAATGCCCTAACGCC  
CTCCGCCGGCTAGTGACGTCGAAAAACTGATCCTCAATTGATTGATTGGCACCGGCACAACCGC

**5CA - *Staphylococcus* (zelo slaba sekvenca)**

**6CA - *Staphylococcus* (slaba sekvenca)**

GATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGATAACTTCGG  
GAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTGAACCGCATGGTCAAAAGTGAAGACGGTCTTGC  
TGTCACTTACATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTACCAAGGCAACG  
ATGC

**7CA - *Staphylococcus* (zelo slaba sekvenca)**

**8CA - *Staphylococcus***

GTAGCATGCGGTGTCTACACTGCAGTCAGCGACAGATAAAAGGAGCTTGCTCCTTGACGTTAGCGG  
CGGACGGGTAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGAAACCGGGC  
TAATGCCGGATAACATGTTGAACCGCATGGTCTACAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACCTATAG  
ATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATACGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGAATCTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTCTC  
GGATCGTAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAATGTGAAGTAACGTCACATCTGACGGTAC  
CTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
TCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCT  
CAACCGTGGAGGGTATTGAAACTGGAAAACCTGAGTGCGAGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTTCTGGTCTGCAA  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGCAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTTCTGGTCTGCAA  
CTGACGCTGATGTGCAGACGGTGAAGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGTTAGTCCACGCC  
AACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCTAACGACTC  
GCCCTGGGAGTCGTCGTAAGACTGAATCTAATTATTGTCGGGGCACCTCATCGTTAG  
ATGCATGCGGATTATTCATATCACGAGAAGAGCTGTCT

**9CA - *Staphylococcus***

GAGGTAGAGCGCTGTCTACATGCAGTCAGCGACGGGAGAAAGCTTGCTTCTGTATGTTAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGG  
GCTAATACCGGATAATATTTGAACCGCATGGTCAAAAGTGAAGACGGTCTTGCTGTCACCTAT  
AGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGC  
CGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGC  
AGTAGGAAATCTCGCAAGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTCT  
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTAGGAAAGAACATATGTGAAGTAACGTCACATCTGACGGT  
ACCTAATCAGACCGCCTCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTGGCAATCGT  
ATCCGAAATTATTGAGCGTAACTCTCGCTCATGCTGTTTTAATTCTGATCTGACAGCCCACGCC  
CAACCTTGAGGGTAATTGACAATTCAAACATTGAGCATGAGCACAGGTCTGCTATGC

ATCCATCAACGACTATCCCTCCTCAGGTACACTCAACCCTCACTGCAAGCACCAAGCTCTACCTTT  
GTGTAATGCTACTCTACTACATGAGTTAAAGTGTGTTGTCCTGTATACTCTATGAGATAT  
ATTATTAAGTAGGTT

**10CA - *Staphylococcus***

GAACGGCGAGCGGTGCCCTATACTGCAGTCGAGCGACGGACGAGAAGCTTGCTTCTGTATGTTAG  
CGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGATAACTTCGGAAACCGG  
AGCTAATACCGATAATATTGAAACCGCATGGTCAAAAGTGAAGAACGCGTCTTGCTGTCACTTA  
TAGATGGATCCGCCGTGCATTAGCTAGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAG  
CCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTAGGGAATCTCCGCAAAGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAATGAGTC  
TTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGAAGTAACGTGACATCTGACGG  
TACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTGAAGCGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG  
GCTCAACCGTGGAGGGTATGGAAACTGCACAACCTCACTGCTGAATATCACAAATGCCACCCACT  
ATGCCATCGTCAAAGTCCGACAACACTCGCTGAATTCCAGCATCCCTCACGCCGTGCGTCCCC  
CCTATCTCAGTGAAGCTCCATGCTTACCTAGATCACTATGACAAGGATGTACTAAAAATTATC  
AGGAGATGATGTAGAGTGTATCGTCCAAACCTGACCTCATCCTCTGTAGTGGCTCGGTTGCCTT  
AGCCGTGTGATTGTGGGTTGTGATT

**12CA - *Rothia***

GGAAAGCGGTGCTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACG  
GGTAGAGTAACCGTGAAGTAACCTGCCTTAACTCTGGGATAAGCCTTGGAAACGAGGTCTAACCTAC  
GGATACGACTAGTCCCGATGGATGCTGGTGGAAAGGGATATGTAACGGTTTTAGATGGGCTCA  
CGGCCTATCAGCTTGGTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGTAGCCGGCTGAGAG  
GGTACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAT  
ATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA  
AACCTTTCAAGCAGGAAAGCAGAAAGTGAACGGTACCTGCAGAAGAACGCGGGCTAACACTACG  
TGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGGCGCAGCGTTGCCGAATTATTGGCGTAAAGAGCTT  
GTAGGCAGTTGTCCGTCTGTTGAAAGCCGGGCTTAACCCGGTTGAGTGGTACGGG  
CTAACTACAGTCACTAGGGAGACTCGAATCCCTGGCGTAGAGGTGATATGTCAGATATCAAT  
ATGATCACCAATACCAAGGCAGGTCTCGACTCTAACCTCCGCTGACAAGCAATAGCATCGAC  
CAACACTAAGCGCAATCACACTCGTATACCTCAAACAGTATAACACGAGATATGCTTAGTT  
ATCACGTCACTGATGTTGAGTGTACCTACAGAATTAAAGTGAATCCATACTTGTGAGTAATT  
GTCCTCATGCTACATCTCATTTATTGAGTTGTTCTAGGGACGCGAGT

**13CA - *Bacillus***

GGACGGCGGTGCTACTGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTGCTCCGGATGTTAGCGGCGG  
ACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAA  
TACCGGATAGTCCCTGAACCGCATGGTCAAGGATGAAAGACGGTTCGGCTGTCACTACAGAT  
GGACCCGCGCGCATTAGCTAGTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC  
CTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGGTTTCGG  
ATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAACAAAGTGAAGAGTAACGTCTGCTTCCCTGACGGTACCT  
AACAGAAAGCCTCCGTTACTACGTGCCAGCAGCCGCGCATTACGTAGGTGGCTAACGTTTC  
CGGAATTATTGGCGTAAAGGGCTGTACGCCGCTTCCCTATTATTATGTGTCAGCCACCGAACCA  
CACTTAGAGGTGCTTGCCTGCGACTGGTGTACCCAGTACTGATTATCTGAGTAATGGCGTCTCTGCT  
TTCGTTCAAGATTCTCCGACATCCTGCATCTACACTACAGCAGGCTTTATCTCTGCTG  
TGCTCGCTACTATATAACTAAATGCTATTCCCTAGATTACTATCTATATTGAGGTACACTAATAG  
TATCTATACATCATGTCTAGT

**5DA - *Brachybacterium***

CACTGCCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCACTTCGGATAAC  
CTCGGAATCGTGGCTAAACCGGATATGAGCTCCTGCCGATGGTGGGTGCTGGAAAGATTAT  
CGGTGAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGTTGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGCAGTAC  
GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCGACGCCGCGTGGGGAT  
GACGGCCTCGGGTTGTAACCCCTTCAGTAGGGAAGAACGAAAGTGAACGGTACCTGCAGAAC  
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAACCGTTGTCCGGAATT  
ATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGTACGTCTGCCGTAAAACCGAGGCTAACCTCG

GGCGTGCCTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAACCTCCTGGTAGCGGT  
GAAATGCGCAGATA

**6DA - *Brachybacterium***

GCACTGCCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCACTTCGGGATAA  
CCTCGGGAAATCGTGGCTAATACCGGATATGAGCTCCTGCCCATGGTGGGTGCTGGAAAGATTAA  
TCGGTGAGGATGGACTCGCGCCTATCAGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGA  
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACCG  
GAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGA  
TGACGGCCTTCGGGTTGAAACCCCTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGAACGGTACCTGCAGAA  
GAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGAAGCGTTGTC

**7DA - *Oceanobacillus***

GGGTGACGCTTGTGGAATGAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACT  
GGGATAACCCCAGGAAACCGGGCTAATACCGATAATACTTCTTTGCATAAAGGAAAGTTGA  
AAGGCCTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACCG  
CTCACCAAGGCACGATCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA  
ACGCCGCGTAGTGAAGGTTTGGATCGTAAACTCTGTTAGGGAAGAACAAAGTTGG  
TAGTAACTGACCAACCTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC

**9DA - *Bacillus***

AGAAGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCG  
GGAAACCGGGCTAATACCGATAACATTGAACTGCATGGTCGAAATTGAAAGGCGCTTCG  
GCTGTCACTTATGGATGGACCCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAA  
CGATCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGT  
GATGAAGGCTTCGGTCGTAACACTCTGTTAGGGAAGAACAAAGTGTAGTTGAATAAGCT

**10DA - *Bacillus (slaba sekvenca)***

GATTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCCTGTAGATTGGATAACTCCGG  
AAACCGGGCTAATACCGATAATCCATTTCACATGGGAGATGTTAAAGACGGTTTCGGCT  
GTCACTACAGGATGGGCCCGCGCATTAACTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCGACG  
ATCGTAACCCAACGTGAAAGGGTAGCAGGCCACACTGGGACTGA

**11DA - *Bacillus***

CTGCCCATAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGATAACATTGAACTGCA  
TGGTCGAAATTGAAAGCGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCCGCGTCGATTAGCTAGTT  
GGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCAGGCCACACTG  
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAA  
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGGTTTCGGTCGTAACACTCTGTTAGGGA  
AGAACAAAGTGTAGTTGAATAAGC

**13DA - *Bacillus***

GGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGCT  
AATACCGATAATATTGAACTGCATGGTCGAAATTGAAAGGCGCTTCGGCTGTCACTTATGG  
ATGGACCCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATCGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGAAGGTTTC  
GGGTGTAACACTCTGTTAGGGAAGAACAAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTGACGGT  
ACCTAACCAAGAACGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG  
CTCAACCG

**14DA - *Bacillus***

AAGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCGG  
AAACCGGGCTAATACCGATAATATTGAACTGCATGGTCGAAATTGAAAGGCGCTTCGGCT  
GTCACTTATGGATGGACCCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCAACG  
ATCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAGCAGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGT

ATGAAGGCTTCGGTCGTAAAACCTCTGTTAGGAAAGAACAAAGTCTAGTTGAATAAGCTGG  
CACCTGACGGTACCTAACCAAGAACGCCACGGCTAAGTGCAGCAGCCCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCACGGCTCAACC

**15DA - *Bacillus***

AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCGGG  
AAACCGGGCTAATACCGATAATATTGAACTGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCT  
GTCACTTATGGATGGACCCGGCTCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG  
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
ATGAAGGCTTCGGTCGTAAAACCTCTGTTAGGAAAGAACAAAGTCTAGTTGAATAAGCTGG  
CACCTGACGGTACCTAACCAAGAACGCCACGGCTAAGTGCAGCAGCCCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCACGGCTCAACCCTGGAGGGTATTGAAACTGGGAGACTGAGTGCAGAAGAGGAA  
AGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAACTGGCGAAGGCGA  
CTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCAAAGCGTGG

**3EA - *Bacillus***

CCTTATACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAACCGGATAATCCCTTCTCACCTGGAGA  
GAGGGTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTAGGGATGGGCCGCGCATTATCTAGTTGGTAA  
GGTAACGGCTTACCAAGGCAGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTG  
ACGGAGCAACGCCGCGTAGTGGAGGAAGGCCTTCGGTC

**5EA - *Micrococcus* (zelo slaba sekvenca)**

**6EA - *Micrococcus***

AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACCTGGGATAAGCCTGGAAACT  
AGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCTACCGCATGGTGGGTGTTGAAAGATTATCGGTTTGGAT  
GGACTCGCGGCCTATCAGCTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGC  
CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCGAGCAGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG  
GTTGAAACCTCTTCAGTAGGAAAGAACGAAAGTACGTTAGGGTGCAGCGTTACCTGCAGAAGAACCGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTACCTGCAGAAGAACCGGCTA  
GAGCTGTAGGCGGTTGCGCTCTGCGTAAAGTCCGGGCTTAACCCGATTCGCGTGGG  
TACGGGAGACTAGAGTG

**7EA - *Micrococcus* (zelo slaba sekvenca)**

TTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGCAACACGTGAGTAACCTGCCCTAACCTGGGAT  
AAGCCTGGAAACTGGGTCTAACCGGATAGGAG

**8EA - *Janibacter***

GCTGGAGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGAAATA  
AGCGCTGGAAACGGCGTCTAACACTGGATACGAGAACGGTCCGCATGGCACTTCTGGAAAGTT  
TTCGGTTGGGATGGCTCGGGCTATCAGCTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGGCAGC  
ACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAACATGGCGAAAGCCTGATGCGAGCAGCCGCGTGAGGG  
ATGACGGCCTTCGGGTTGAAACCTCTTCAGCAGGGAAAGAACGAAAGTACGTTACCTGCAGA  
AGAACGACCGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAA  
TTATTGGCGTAAAGAGCTTGAGGCGTTGCGCTCTGCTGTAAAATCCGGGCTAACCCCC  
GGACTTGCAGTGGGTACGGGAGACTAGA

**9EA - *Acinetobacter* (zelo slaba sekvenca)**

CTACTTGACCTAGCGCGGACGGGTGACTCATGCTTAGGAATCTGCCTATTACTGGGGACAACAT  
CTCAAACGGGATGCTAACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCTTGCG

**14EA - *Pseudomonas* (zelo slaba sekvenca)**

TTCCCTGATTTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCCTAGGAATCTGCCCTGGTAGTGGGGACAACGT  
TTCGAAAGGAACGCTAACCGCATACTGCCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCTTGCG

CTATCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCC  
GTAACTGGTCTGAGA

**15EA - *Staphylococcus***

CCTTTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAAAC  
TTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGATAAGATTGAACCGCATGGTCAATAGTCAAAGACGGC  
CTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTTACCAAGG  
CAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACT  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT  
AGTGATGAAGGTCTCGGATCGTAAAACCTGTTATCAGGGAAAGAACAAACGTGTAAGTAACGT  
GCACGTCTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC  
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTTTAAGTCTGA  
TGTGAAAGCCCACGGCTAACCGTGGAG

**16EA - *Rhodococcus***

GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGT  
CTAATACCGGATATGACTTCAGGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGATTATCGGTGCAGGATGGC  
CCCGGGCCTATCAGCTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGCGGTTAGCCGACCTGA  
GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
AAATATTGACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT  
GTAAACCTCTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCAGCTAAGT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGAATTACTGGCGTAAAGAG  
TTCGTAGGCGGTTGTCGCTCGTGTGAAAACCAGCAGCTAACACTGCTGGCTTGCAAGCGATAC  
GGCAGACTTGAGTACTGCAGGGAGACTGGAAT

**1FA - *Macroccoccus***

CTTGCACTCCTTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTACCTACCTATAAGACTGG  
GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCACCTCATGGTGGAAATAGTAAA  
GACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTCA  
CCAAGGCAGCATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CCCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTAAGGGAAAGAACAGTACGTTAGT  
AACTGAACGTACCTTGACGGTACCTTACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTCTAA  
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC

**3FA - *Macroccoccus***

TTGCACTCCTTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTACCTACCTATAAGACTGG  
GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGATAATATTTCACCTCATGGTGGAAATAGTAAA  
GACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAACGGCTCA  
CCAAGGCAGCATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CCCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTAAGGGAAAGAACAGTACGTTAGT  
AACTGAACGTACCTTGACGGTACCTTACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGGTTCTAA  
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC

**7FA – *Escherichia***

CTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGG  
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGCCTTGCCT  
CGGATGTGCCAGATGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCAGGATCCCTAG  
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGAATTGACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC  
TTCGGGTTGTAAGTACTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAACCTTGCTATTGACGT  
TACCGCAGAAGAACCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCG  
TTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCG  
GGCTAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCC  
AGGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAG

**8FA - *Staphylococcus***

GACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGG  
GAAACCGGGGCTAATGCCGATAACATGTTAACCGCATGGTCTACAGTGAAAGACGGTCTTGC  
TGTCACTTATAGATGGACCCCGCCGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAGC  
ATCCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGATCCATACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGCAATCTCCGCAAT

**9FA - *Rhodococcus***

GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGTGATCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCTGGAAACTGGG  
TCTAATACCGGATATGACCTCCTATCGCATGGTGGTGGAAAGATTATCGGTGCAGGATGGG  
CCCGCGGCCCTATCAGCTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGCGGTTAGCCGACCTG  
AGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTCGGGT  
TGTAAACCTCTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGCCGAATTACTGGCGTAAAGA  
GTTCTAGGCGGTTGTCGCGTCTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTGCAGGCGATA  
CGGGCAGACTTGAGTACTG

**11FA - *Microbacterium***

TCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAACAGTTGGAAA  
CAGCTGCTAATACTGGATACGAACACTGCGATCGCATGGTCGGCAGTTGGAAAGAATTTCGGTCAGG  
GATGAGCTCGCGGCCCTATCAGCTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGCGGTTAGCC  
GGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGAAATTGCACAATGGCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT  
TCGGGTTGAAACCTCTTCAGCAGGGAAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGAATTATTGGCG  
TAAAGAGCTCGTAGGCGGTTGTCGCGTCTGCTGTGAAATCCGAGGCTAACCTCGGCCCTGCAG  
TGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTGAGGGAGATTGAAATTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGC  
AGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAACTGACGCTGAGGAGCG  
AAAGGGTGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGAAACTAGT  
TGTGGGTCATTCCACGGATTCCGT

**13FA - *Kocuria***

ATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCGGAA  
ACTGGGCTAATACTGGATGCTACATGTCACCGCATGGTGGTGTGGAAAGGGTTACTGGTCTT  
GGATGGGCTCACGCCCTATCAGCTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGCGGTTAGC  
CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGAAATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT  
TCGGGTTGAAACCTCTTCAGCAGGGAAAGCCACAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGCCGAATTATTGGC  
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGCCGGGCTAACCCGGGTGCA  
GTGGGTACGGGCAGACTA

**16FA - *Rhizobium***

GAGTAACACGTGGGAACGTACCTTACTACGAAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAACCGTA  
TGTGCCCTCGGGGAAAGATTATCGTAAGGATCGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGG  
GTAAAGGCCTACCAAGGCAGCAGCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATGCCACATTGGGACTG  
AGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGGACAATGGCGCAAGCCTG  
ATCCAGCCATGCCCGTGTGATGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCACTTCACCGAGAAGATA  
ATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGG  
GCTAGCGTTGTCGAAATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCAGGATATTAAAGTCAGGGTGAA  
ATCCCAGAGCTAACCTGGAACTGCCCTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGG  
AATTGCGAGTGTAGAGGTG

**19FA - *Macrococcus (slaba sekvenca)***

CGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCGGGAAACCGG  
AGCTAACCGGATAATATTTCCTCATGGTGGAAACTGAAAGACGGTCTGCTGCACTT

**20FA - *Pseudomonas***

TCTTCGATTCAAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGT  
TTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTCAGGGCCTTGC  
CTATCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTCACCAAGGGACGATCC  
GTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGGCATGCCGTGTGAAGAA  
GGTCTCGGATTGTAAGCACTTAAGTTGGAGGAAGGGCAGTAAGCGAATACCTTGCTGTTTG  
ACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGA  
AGCGTTAACCGAACATTACTGGCGTAAGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCC  
CCGGGCTAACCTGGGAACCTGCATCCAA

**21FA - *Acinetobacter***

AGCGGCAGGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGG  
ATGCTAATACCGCATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTCAGGGCCTTGCCTAATAGATG  
AGCCTAACGTCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGGATCTGTAGCGGGTC  
TGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG  
GGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGGCATGCCGTGTGAAGAAGGCCTTTGG  
TTGTAAGCACTTAAGCGAGGAGGGCTACCGAGATTAATACTCTTGATAGTGGACGTTACTC  
GCAGAATAAGCACCGGCTAACACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAAT  
CGGATTTACTGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGCCAATTAAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTT  
AACTGGGAATTGCATTG

**22FA - *Rhizobium***

AGTAACCGTGGAACATACCCTTCTACGGAATAGCTCTGGAAACTGGAATTAAACCGTATA  
CGCCCTACGGGGAAAGATTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGG  
TAAAGGCCTACCAAGGCAGGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGA  
GACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGAT  
CCAGCCATGCCGTGAGTGATGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTTTCACCGATGAAGATAATG  
ACGGTAGTCGGAGAAGAACCCCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCT  
AGCGTTGTTCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCAGGATTTAAGTCAGGGGTGAAATC  
CCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAAT  
TGCAGTGTAGAGGTGA