

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara BLAŽIČ

**RAZVOJ GENETSKIH ORODIJ ZA PRIPRAVO  
METAGENOMSKIH KNJIŽNIC INDUSTRIJSKO  
POMEMBNIH ENCIMOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara BLAŽIČ

**RAZVOJ GENETSKIH ORODIJ ZA PRIPRAVO METAGENOMSKIH  
KNJIŽNIC INDUSTRIJSKO POMEMBNIH ENCIMOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF GENETIC TOOLS FOR THE PREPARATION OF  
METAGENOMIC LIBRARIES OF INDUSTRIALLY IMPORTANT  
ENZYMES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Blaž Stres, za somentorja doc. dr. Tomaž Accetto ter za recenzentko prof. dr. Darja Žgur-Bertok.

Mentor: doc. dr. Blaž Stres

Somentor: doc. dr. Tomaž Accetto

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in razgovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Blaž STRES

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Blažič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.6:579.22/.26:577.15(043)=163.6
KG	gensko inženirstvo/metagenomika/metagenomske knjižnice/mikrobne združbe/kunci/mikrobiota slepega črevesa/encimi/rastlinski polisaharidi/izolacija DNK/plazmidi/kloniranje/presejalni testi
AV	BLAŽIČ, Barbara
SA	STRES, Blaž (mentor)/ACCETTO, Tomaž (somentor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	RAZVOJ GENETSKIH ORODIJ ZA PRIPRAVO METAGENOMSKIH KNJIŽNIC INDUSTRIJSKO POMEMBNIH ENCIMOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 6 pregl., 21 sl., 3 pril., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Prokarionti so sposobni rasti v raznolikih ekosistemih, zato proizvajajo encime, ki so stabilni in aktivni v različnih razmerah. Takšni biokatalizatorji so zanimivi zaradi potencialne uporabe v industrijskih procesih. Tradicionalno so encime pridobivali iz bakterijskih izolatov, kar je bila glavna omejitev apliciranja takega načina pridobivanja v industriji, saj večine mikroorganizmov ne znamo gojiti v laboratoriju. Področje metagenomike se je razvilo iz napredka pri metodah izolacije DNK in kloniranju okoljskih vzorcev. V okviru diplomskega dela smo želeli pripraviti metagenomsko knjižnico, ki bi vsebovala rekombinantni sev z encimom, ki depolimerizira enega od rastlinskih polimerov. Metagenomsko DNK, izolirano iz vsebine kunčjega slepega črevesa, smo uporabili za pripravo plazmidne knjižnice. Za vzorec smo izbrali vsebino kunčjega slepega črevesa, ker vsebuje mikroorganizme, ki so sposobni razgrajevati lignocelulozo. Določili smo taksonomsko hierarhijo in primerjavo 16S rRNK knjižnic mikrobnih združb kunčjega slepega črevesa ter ugotovili, da v vzorcu lahko pričakujemo raznolike mikroorganizme z encimi, ki razgrajujejo kompleksne rastlinske polimere. Iz vzorca smo izolirali kvalitetno kromosomsko DNK ter pripravili inserte primerne dolžine. Pridobili smo metagenomsko knjižnico, veliko $18,1 \times 10^6$ bp. Vsebovala je 5880 rekombinantnih sevov, pri katerih je bila povprečna dolžina inserta 3081 bp. Knjižnico smo s presejalnimi testi pregledali za pozitivne rekombinantne seve z iskano encimsko aktivnostjo. Z gojenjem na trdnih gojiščih s primernimi substrati nismo našli pozitivnega rekombinantnega seva. V tekočih gojiščih s posameznimi substrati smo inkubirali združene mešanice rekombinantnih sevov, ki so bili ali celi ali pa lizirani z ultrazvokom. Inhibirali smo celično rast ter dodali reagent PAHBAH, ki ob prisotnosti reduktivnih sladkorjev spremeni barvo. Rezultatom smo sledili spektrofotometrično in zasledili rekombinantne seve, ki so razgrajevali dodane substrate (celuloza, ksilan, škrob, pektin, lichenan, laminarin in gelan).

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 602.6:579.22/.26:577.15(043)=163.6  
 CX genetic engineering/metagenomics/metagenomic libraries/microbial communities/rabbits/caecal microbiota/enzymes/plant polysaccharides/DNA extraction/plasmids/cloning/screening  
 AU BLAŽIČ, Barbara  
 AA STRES, Blaž (supervisor)/ACCETTO, Tomaž (co-advisor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2011  
 TI DEVELOPMENT OF GENETIC TOOLS FOR THE PREPARATION OF METAGENOMIC LIBRARIES OF INDUSTRIALLY IMPORTANT ENZYMES  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XII, 66 p., 6 tab., 21 fig., 3 ann., 54 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Prokaryotes are able to grow in a vast range of environments therefore are carrying enzymes that are stable and active under diverse conditions. These biocatalysts are interesting because of their potential use in industrial processes. Traditionally, bacterial isolates were the only source of biocatalysts and that was considered the main limitation to application of biocatalysts in industry because the majority of microorganisms are nonculturable. The field of metagenomics developed from progress in DNA isolation methods and cloning techniques from environmental samples. In the context of the graduation work, our goal was to prepare a metagenomic library with a clone that was capable of depolymerising one of plant polymers. Metagenomic DNA, isolated from the content of rabbit caeca was used to generate a plasmid library. Our sample was used because it contains microorganisms that are capable of lignocellulose degradation. We also determined the taxonomic hierarchy of rabbit caecal 16S rRNA libraries which are accessible in the online databases and compared them. Results show that we could expect diverse microorganisms with complex enzymes that break down plant polymers in our sample. We extracted quality chromosomal DNA and prepared inserts of appropriate size. The size of generated metagenomic library was  $18,1 \times 10^6$  bp with 5880 clones and average insert size of 3081 bp. The library was screened for positive clones with functional-based analysis. No positive clones were found by growing on solid medium. In liquid media with various substrates the mixture of clones, either whole cells or cells broken by ultrasound, were grown. We inhibited cell growth and added PAHBAH reagent that changes color in the presence of reducing sugars. Results were determined spectrophotometrically and clones that are capable of plant polysaccharide (cellulose, xylan, starch, pectin, lichenan, laminarin and gellan) degradation were discovered.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 KUNCI .....	3
2.2 RASTLINSKA BIOMASA .....	4
2.3 PROFIL BAKTERIJ V SLEPEM ČREVESU .....	4
<b>2.3.1 Mikrobna aktivnost v slepem črevesu .....</b>	<b>5</b>
2.4 METAGENOMIKA .....	6
<b>2.4.1 Izolacija in priprava metagenomske DNK na kloniranje.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.2 Izbira vektorja in gostiteljskega organizma ter priprava metagenomske knjižnice .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.3 Analiza metagenomske knjižnice .....</b>	<b>11</b>
2.5 UPORABA ENCIMOV .....	13
<b>2.5.1 Čista energija .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.2 Celulaze .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.3 Ksilanaze .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 POTEK DELA .....	17
3.2 MATERIALI .....	18
<b>3.2.1 Vzorec .....</b>	<b>18</b>

<b>3.2.2</b>	<b>Gojišča .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Raztopine in kemikalije .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Genotip gostitelja.....</b>	<b>20</b>
3.3	METODE .....	21
<b>3.3.1</b>	<b>Analiza mikrobne združbe v slepem črevesu.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Priprava insertov .....</b>	<b>21</b>
3.3.2.1	Izolacija DNK.....	21
3.3.2.2	Agarozna gelska elektroforeza .....	22
3.3.2.3	Delna restrikcija .....	22
3.3.2.4	Priprava insertov na ligacijo.....	23
<b>3.3.3</b>	<b>Priprava vektorja .....</b>	<b>23</b>
3.3.3.1	Izolacija plazmidne DNK.....	23
3.3.3.2	Restrikcija.....	24
3.3.3.3	Priprava vektorja na ligacijo.....	24
<b>3.3.4</b>	<b>Ligacija .....</b>	<b>25</b>
3.3.4.1	Priprava kemično kompetentnih celic .....	25
3.3.4.2	Priprava kompetentnih celic za elektroporacijo .....	26
3.3.4.3	Transformacija kemično kompetentnih celic .....	26
3.3.4.4	Elektroporacija .....	27
3.3.4.5	Pregledovanje dolžine insertov .....	27
3.3.4.6	Določanje optimalne velikosti knjižnice za pridobitev rekombinantnega seva z želeno lastnostjo .....	28
<b>3.3.5</b>	<b>Presejalni fiziološki testi za preverjanje encimske aktivnosti.....</b>	<b>28</b>
3.3.5.1	Presejalni testi na trdnih gojiščih.....	29
3.3.5.2	Presejalni testi v tekočih gojiščih .....	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
4.1	ANALIZA MIKROBNE ZDRUŽBE V SLEPEM ČREVESU .....	31
<b>4.1.1</b>	<b>Taksonomska uvrstitev .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Primerjava knjižnic.....</b>	<b>33</b>
4.2	INSERT .....	35
4.3	VEKTOR.....	36
4.4	DOLOČANJE OPTIMALNE VELIKOSTI KNJIŽNICE ZA POPOLNO POKRITOST KNJIŽNICE IN PRIDOBITEV REKOMBINANTNEGA SEVA Z ŽELJENO LASTNOSTJO .....	37
4.5	LIGACIJA, TRANSFORMACIJA IN ANALIZA DOLŽINE INSERTOV .....	39
<b>4.5.1</b>	<b>Ligacija z inserti A in kemična transformacija .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Ligacija z inserti B in transformacija z elektroporacijo.....</b>	<b>41</b>

<b>4.5.3</b>	<b>Ligacija z inserti C in transformacija z elektroporacijo.....</b>	<b>42</b>
4.6	PRESEJALNI FIZIOLOŠKI TESTI ZA PREVERJANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI.....	44
4.6.1	Presejalni testi na trdnih gojiščih.....	44
4.6.2	Presejalni testi v tekočih gojiščih .....	45
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>60</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Več primerov funkcijske analize metagenomskih knjižnic za nove biomolekule iz različnih ekosistemov (Mocali in Benedetti, 2010: 499; Uchiyama in Miyazaki, 2009: 617). .....	12
<b>Preglednica 2:</b> Seznam pri delu uporabljenih raztopin in kemikalij. ....	20
<b>Preglednica 3:</b> Število rekombinantnih sevov, potrebnih za detekcijo poljubne sekvence genoma <i>E. coli</i> določene dolžine pri izbrani verjetnosti (P) .....	38
<b>Preglednica 4:</b> Določanje približne dolžine insertov A iz rekombinantnih sevov pripravljenih s kemično transformacijo.....	40
<b>Preglednica 5:</b> Določanje približne dolžine insertov B iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo. ....	42
<b>Preglednica 6:</b> Določanje približne dolžine insertov C iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo. ....	43

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shematični pregled priprave metagenomske knjižnice iz različnih ekosistemov in analiza le-teh na osnovi funkcije ali zaporedja (Sleator in sod., 2008: 362).....	7
<b>Slika 2:</b> Shematski prikaz poteka dela. ....	17
<b>Slika 3:</b> Grafični prikaz taksonomske primerjave knjižnic (Abecia in sod., 2005; Monteils in sod., 2008; Fanedl in sod., 2009) na nivoju debel.....	33
<b>Slika 4:</b> Izolacija kromosomske DNK obdelane z encimom RNazo. ....	35
<b>Slika 5:</b> Primer agarozne (0,8 %) gelske elektroforeze delne restrikcije kromosomske DNK. ....	35
<b>Slika 6:</b> Preverjanje upešnosti cepljenja in čiščenja kromosomske DNK po delni restrikciji. ....	36
<b>Slika 7:</b> Očiščen cepljen plazmid pUC19. ....	36
<b>Slika 8:</b> Cepljena, očiščena ter defosforilirana plazmidna DNA. ....	37
<b>Slika 9:</b> Odvisnost števila potrebnih rekombinantnih sevov v knjižnici od dolžine inserta pri različnih verjetnostih za <i>E. coli</i> .....	38
<b>Slika 10:</b> Analiza insertov A (iz rekombinantnih sevov pripravljenih s kemično transformacijo) z uporabo programa GeneTools.....	40
<b>Slika 11:</b> Analiza insertov B (iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo) z uporabo programa GeneTools. ....	41
<b>Slika 12:</b> Analiza insertov C (iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo) z uporabo programa GeneTools. ....	43
<b>Slika 13:</b> Histogram, ki prikazuje število rekombinantnih sevov pri določeni velikosti inserta. ....	44
<b>Slika 14:</b> Petrijevki z gojiščem LB z ampicilinom ter IPTG, ki smo jima dodali škrob ali ksilan ter ju obarvali z lugolom. ....	45

- Slika 15:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za CMC. .... 46
- Slika 16:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za ksilan. .... 46
- Slika 17:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za pektin. .... 47
- Slika 18:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za gelan. .... 47
- Slika 19:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za laminarin. .... 48
- Slika 20:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za škrob. .... 48
- Slika 21:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za lichenan. .... 49

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti A z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

**Priloga B:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti B z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

**Priloga C:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti C z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>BAC</b>	umetni bakterijski kromosom ( <i>angl.</i> bacterial artificial chromosome)
<b>bp</b>	bazni par
<b>cDNK</b>	komplementarna DNK ( <i>angl.</i> complementary DNA)
<b>CF</b>	surove vlaknine ( <i>angl.</i> crude fibre)
<b>CMC</b>	karboksimetil celuloza
<b>CP</b>	surovi proteini ( <i>angl.</i> crude protein)
<b>CTAB</b>	heksadeciltrimetilamonijev bromid
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDTA</b>	etilendiamintetraocetna kislina
<b>IPTG</b>	izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
<b>mRNK</b>	informacijska RNK ( <i>angl.</i> messenger RNA)
<b>NCBI</b>	<i>angl.</i> National Center for Biotechnology Information
<b>OD<sub>420</sub></b>	optična gostota pri valovni dolžini 420 nm
<b>PAHBAH</b>	hidrazid parahidroksi benzojeva kislina
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl.</i> polymerase chain reaction)
<b>RNK</b>	ribonukleinska kislina
<b>rRNK</b>	ribosomska RNK ( <i>angl.</i> ribosomal RNA)
<b>SDS</b>	natrijev dodecil sulfat
<b>TBE</b>	Tris-borat-EDTA
<b>TE</b>	mešanica pufrov Tris in EDTA
<b>UV</b>	ultravijolična svetloba
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

## 1 UVOD

Mikroorganizmi predstavljajo dve tretjini celotne biološke raznolikosti na Zemlji. S tradicionalnimi pristopi za raziskovanje mikrobne biodiverzitete v okolju velike večine mikroorganizmov ne zaznamo, ker jih ne znamo gojiti na klasičen način. Ta način vključuje njihovo gojenje pri določenih razmerah na trdnih ali v tekočih gojiščih, ki jim je dodan primeren vir ogljika, energije in elektronskega akceptorja. Vendar pa takšno gojenje v laboratoriju povzroča selekcijski pritisk in s tem preprečuje rast velikega števila mikroorganizmov. Tu nastopi metagenomika, ki nam omogoča analizo mikrobnega genoma brez predhodnega namnoževanja mikroorganizma. Tako se nam odpre svet še neznanih mikroorganizmov in s tem tudi neznanih ter edinstvenih encimskih procesov, ki jih s pridom lahko izkoriščamo in uporabljamo v industriji ter vsakdanjem življenju. V industriji encimska tehnologija predstavlja pomembno orodje, saj z razvojem tehnoloških procesov nastajajo vedno večje potrebe po novih ali izboljšanih različicah biokatalizatorjev encimskih reakcij. Za odkrivanje novih variant encimov tako uporabljamo metagenomski pristop. Pripravljajo se velike metagenomske knjižnice fragmentov genomske DNK, izolirane iz okolja, ki se nato testirajo za različne industrijsko pomembne encime. Nas so zanimali encimi za razgradnjo rastlinskih polimerov iz mikrobiote kunčjega slepega črevesa. Le-ta vsebuje veliko število mikroorganizmov z visoko sposobnostjo depolimerizacije kompleksnih rastlinskih polisaharidov. Omenjeni encimi se v industriji zelo pogosto uporabljajo, in to predvsem v prehrambeni, tekstilni, kozmetični in papirni ter v gospodinjstvu, kmetijstvu, medicini in znanosti.

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Glavni cilj diplomskega dela je bil pridobiti in odkriti rekombinantni sev z encimom, ki depolimerizira enega od rastlinskih polimerov. V ta namen smo najprej določali taksonomsko hierarhijo 16S rRNK knjižnic mikrobnih združb kunčjega črevesa, ki so dostopne v podatkovnih zbirkah na spletu. Predvidevali smo, da bomo tako dobili podatke o mikroorganizmih, ki najpogosteje naseljujejo slepo črevo kunca, in posledično tudi o tem, katere encime lahko pričakujemo v našem vzorcu ter ali lahko pričakujemo encime, ki razgrajujejo kompleksne rastlinske polimere. Nato smo knjižnice med seboj primerjali, da bi dobili vpogled v raznolikost mikrobiote slepega črevesa ter razlike med različnimi študijami. Sledila je priprava metagenomskih knjižnic z dolžino fragmentov, ki ustrezajo dolžini posameznih genov. Ekstrakcijo kvalitetne DNK iz kompleksnega vzorca kunčjega črevesa smo optimizirali in jo klonirali kot dovolj dolge fragmente DNK v vektor, ki smo ga prenesli v gostitelja *E. coli*. Nazadnje smo rekombinantne seve testirali s presejalnimi fiziološkimi testi na trdnih in v tekočih gojiščih.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Prebavila kuncev predstavljajo primeren vir hidrolitičnih encimov rastlinskih polimerov.
- Iz vsebine kunčjega slepega črevesa ekstrahirana DNK je primerne kvalitete za pripravo insertov metagenomske knjižnice.
- Dolžine kloniranih fragmentov metagenomske DNK bodo v rangi dolžin tarčnih genov.
- Razviti presejalni testi omogočajo zaznavo pozitivne aktivnosti izraženih genov.
- Metagenomska knjižnica bo vsebovala nekaj rekombinantnih sevov z encimi, ki so sposobni depolimerizacije enega od rastlinskih polimerov.

## 2 PREGLED OBJAV

Encime komercialno pridobivamo tako iz rastlin in živali kot tudi iz mikroorganizmov. Glavni vir industrijskih encimov so prav slednji (Uchiyama in Miyazaki, 2009). Mikroorganizmi so zelo primerni zaradi tega, ker so tako zelo številčni in raznoliki. Ocenjuje se, da je na Zemlji približno  $4-6 \times 10^{30}$  prokariontskih celic (Sleator in sod., 2008) od tega pa več kot 99 % mikroorganizmov iz mnogih ekosistemov še ne znamo gojiti v laboratoriju. Tako smo močno prikrajšani za nove lastnosti in vloge, ki jih imajo mnogoštevilni mikroorganizmi v svojem naravnem okolju. Z metagenomskim pristopom se izognemo težavam in omejitvam gojenja in takoj pridobimo sekvence DNK večine mikroorganizmov v vzorcu, tudi tistih, ki jih še ne znamo gojiti. Le-ti pa so gonilna sila novih biotehnoloških, farmacevtskih in ostalih industrijskih aplikacij (Streit in Schmitz, 2004). V naravi se torej skriva še neodkrit potencial in metagenomika je ključ za nova odkritja na področju kompleksnih mikrobnih populacij iz različnih ekosistemov. Eden pomembnejših je prebavni trakt sesalcev. Razvijal se je milijone let in vsebuje raznoliko populacijo simbiotskih mikroorganizmov, sestavljeno iz več kot 400 različnih vrst, ki ima velik vpliv na imunološke, prehranske in fiziološke procese gostitelja (Savage, 1977). V preteklosti se je izkazalo, da je mikroflora prebavnega trakta neskončen vir zdravil, encimov, genov in povsem novih produktov, ki jih lahko izkoristimo v različne namene (Singh in sod., 2008). Potreba po novih mikrobni produktih je velika in zaradi neraziskanosti mikrobne združbe, ki ga naseljuje, je prebavni trakt kuncev biotehnološko in industrijsko zelo zanimiv.

### 2.1 KUNCI

Kunci so rastlinojedi neprežvekovalci. Večino njihovega prebavnega trakta predstavlja slepo črevo. To je organ, kjer poteka glavna mikrobna aktivnost, torej na tem mestu kunci pridobijo največ hranil iz zaužite krme. Poleg tega izločajo iztrebke iz debelega in slepega črevesa. Prvi so trdi, slednji pa mehki, imenujemo jih cekotrofi. Posebnost je prehranjevanje z iztrebki slepega črevesa (cekofagija), ki vsebujejo delno prebavljene hranljive snovi, predvsem beljakovine in vlaknine ter precejšen delež mikrobne biomase.



Ta pojav verjetno omogoča boljše izkoristke v prebavi, saj kunec s ponovnim zaužitjem iztrebkov pridobi veliko hranljivih snovi in tako naravno obogati svojo krmo. Zanje je značilen tudi visok vnos krme (65–80 g/kg telesne teže) in hitra prebava (Carabaño in Piquer, 1998).

## 2.2 RASTLINSKA BIOMASA

V krmi rastlinskega izvora prevladujejo polisaharidi skupaj z manjšimi količinami strukturnih glikoproteinov. To so gradniki rastlinske celične stene, ki jih kunci s svojimi prebavnimi encimi niso sposobni razgraditi, in združujemo jih pod skupnim imenom lignoceluloza. Glavni polisaharidi so celuloza, hemiceluloza in pektin. Celulozne mikrofibrile v celični steni rastlin povezuje hemiceluloza, vmes pa se prepleta še pektin, eden od najkompleksnejših polisaharidov. Najpogostejše oblike hemiceluloze so ksilan, ksiloglukan in manan. Na hemicelulozo se kovalentno veže še lignin (Cosgrove, 2005).

## 2.3 PROFIL BAKTERIJ V SLEPEM ČREVESU

Kunci so, kot mnoge druge rastlinojede živali, sposobni prebavljati večino rastlinskih polimerov zaradi prisotnosti mikroorganizmov v prebavilih. Kar 70 % prebave predstavlja mikrobna fermentacija. Populacija mikroorganizmov je v slepem črevesu mnogoštevilna, saj ga naseljuje kar  $10^{10}$ – $10^{11}$  anaerobnih bakterij na gram vsebine slepega črevesa (Padilha in sod., 1995). Prevladujejo torej striktno anaerobne bakterije, katerih substrati so zgoraj omenjeni ogljikovi hidrati in proteini, ki se razgradijo do kratkoverižnih maščobnih kislin in drugih molekul (amini, vitamini, ogljikov dioksid in metan) (Flint in sod., 2008).

O mikrobni diverziteti slepega črevesa pri kuncih je bilo opravljenih več raziskav. Bennegadi in sod. (2003) so s pomočjo hibridizacije dot-blot ocenili mikrobno populacijo slepega črevesa pri kuncih. Le-ti so bili hibridi kalifornijca in novozelandskega belega kunca (INRA A1067). Sonde 16S rRNK so pokazale prevlado skupine *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* ter prisotnost celulolitičnih bakterij (*Fibrobacter succinogenes*, *F. intestinalis*, *Ruminococcus albus* in *R. flavefaciens*). Najbolj zastopani sta

*R. flavefaciens* in *R. albus*. Čeprav je *Prevotella ruminicola* zelo pogosta vrsta bakterij v živalskih prebavnih traktih in so jo prej vključevali v prevladujočo bakterijsko floro kunčjega slepega črevesa, je v tej raziskavi niso zaznali. Abecia in sod. (2005) so slepo črevo pridobili iz novozelandskih belih kuncev. Namnožili so izolirane gene 16S rRNA z metodo PCR, pripravili klonsko knjižnico in analizirali dobljene sekvence. Odkrili so 44 novih vrst, ki so še najbolj podobne že opisanim bakterijam iz prebavnih traktov drugih živali. Našli niso nobene sekvence, ki bi katerega od rekombinantnih sevov uvrščala v skupino *Prevotella/Bacteroidetes*. Izkazalo se je, da le eno zaporedje deli 97-odstotno podobnost s sekvencami iz bakterij, ki so jih našli tudi v prebavilih drugih živali. Poleg tega so določene sekvence spadale v skupino brez znanih predstavnikov, zaradi česa so zaključili, da mikrobná združba v slepem črevesu kunca vsebuje organizme, ki jih do sedaj še niso odkrili. Monteils in sod. (2008) so v svoji raziskavi prav tako preučevali bakterijsko združbo kunčjega slepega črevesa na nivoju 16S rRNK. Za poskus so uporabili kunčje križance INRA 1067 × PS HYPLUS 79. Ugotovili so, da je za prebavni trakt kunca značilna velika diverzitetá. Največ pridobljenih sekvenc je bilo opaženih tudi v drugih herbivorih, in sicer v debelem črevesu kopitarjev in vampu prežvekovalcev. Odkrili so 56 novih nukleotidnih sekvenc, 14 pa jih je bilo zelo podobnih (97 %) že prej sekvenciranim zaporedjem. V deblo *Firmicutes* se je uvrstilo največ (94 %) sekvenc. Zasedili so *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*. Nekaj sekvenc se je uvrstilo v deblo *Bacteroidetes*, nobena pa v rod *Prevotella*. Le ena sekvenca je imela več kot 97 % podobnost z gojeno vrsto, in sicer *Variovorax* sp., ki je bila prej izolirana iz tal.

### 2.3.1 Mikrobna aktivnost v slepem črevesu

Bakterije v slepem črevesu po večini sintetizirajo več encimov, ki razgrajujejo rastlinske polisaharide. Samo nekatere bakterije pa so dejansko vključene v razpad kompleksnih in težko razgradljivih rastlinskih celičnih sten oziroma lignoceluloze. To so celulolitične bakterije, katerih poglavitni vir ogljika je celuloza. V ta namen sintetizirajo celulaze. Ker pa je celuloza nedostopna, saj je močno prepletena z drugimi makromolekulami, so primorane razgrajevati tudi ksilan, manan in pektin. Marounek in sod. (1995) so poročali o aktivnosti pektinaz, amilaz, laktaz, ksilanaz, celulaz, β-glukozidaz ter ureaz v kunčjem

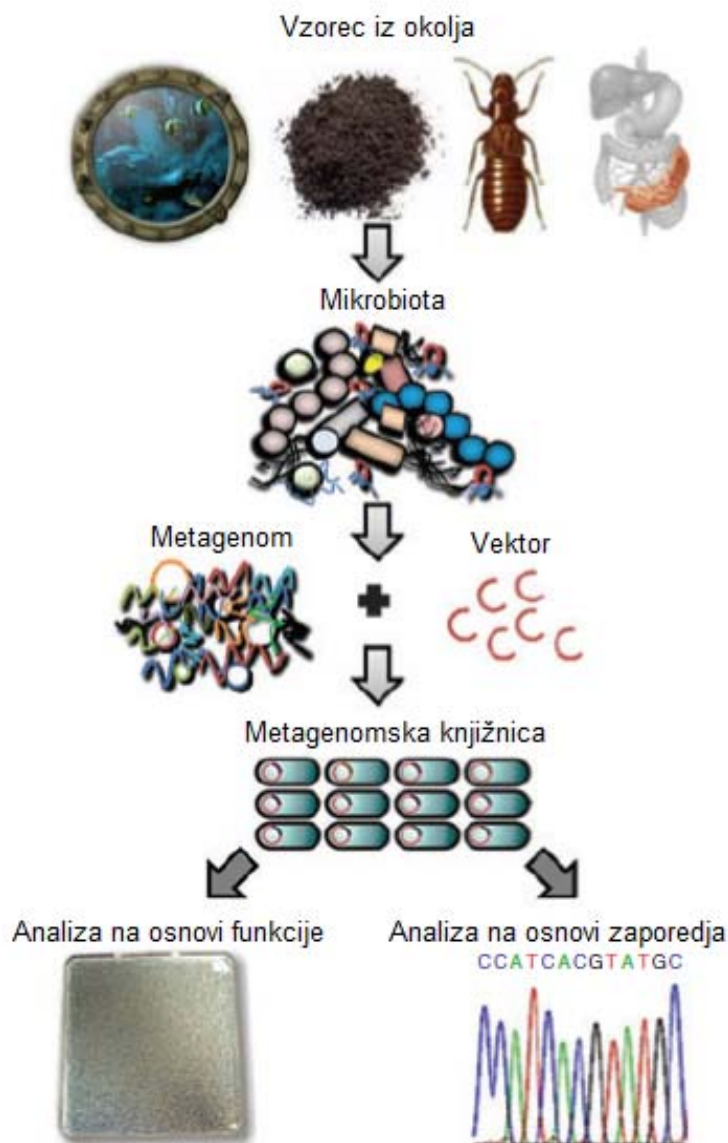
slepem črevesu. Prav tako je aktivnost proteaz in amilaz večja v kunčjem slepem črevesu kot v vampu prežvekovalcev (Makkar in Singh, 1987).

Celulolitične bakterije se pritrdijo na površino rastline v obliki biofilma. Zelo pogosta in tudi dobro preučena celulolitična, po Gramu pozitivna bakterija je *Ruminococcus flavefaciens*. Producira celo vrsto glikozidnih hidrolaz, polisaharidnih liaz in esteraz, ki lahko tvorijo celulosom. Celulosom je ekstracelularni, večkomponentni, multienzimski kompleks, ki ga najdemo v celulolitičnih bakterijah. Omogoča večjo aktivnost različnih encimov za bolj učinkovito razgradnjo celuloznih in hemiceluloznih substratov rastlinske celične stene (Flint in sod., 2008). Tudi *R. albus* združuje celulolitične encime v celulosom, a hkrati uporablja še pile, s katerimi naj bi se po mnenju nekaterih znanstvenikov vezala na celulozo (Morrison in Miron, 2006). *Fibrobacter succinogenes* je ena pomembnejših razgrajevalk celuloze, a ne tvori celulosoma. Vseeno pa se ta po Gramu negativna bakterija za učinkovito porabo celuloze veže na substrat (Flint in sod., 2008). Znano je, da sodeluje pri razgradnji kristalizirane celuloze in drugih strukturnih polisaharidov rastlin s hitrostjo, ki preseže večino drugih mikroorganizmov (Halliwell in Bryant, 1963), kar kaže na to, da so glikozidne hidrolaze *F. succinogenes* zelo učinkovite (Morrison in sod., 2009). Raziskave odkrivajo, da v slepem črevesu najdemo tudi nekaj predstavnikov debela *Bacteroidetes*, ki pa po zadnjih podatkih ne sintetizirajo toliko encimov. Najdemo samo nekaj glikozidnih hidrolaz, ki delujejo kot samostojni encimi, katerih substrati so samo manjši in topni ogljikovi hidrati (Flint in sod., 2008).

## 2.4 METAGENOMIKA

Za uspešno, učinkovito in cenovno ugodno pridobivanje novih naravnih mikrobnih produktov iz okoljskih vzorcev se poslužujemo metagenomike. Omogoča nam dostop do različnih ekosistemov. Mikrobiota kunčjega slepega črevesa, ki fermentira rastlinsko biomaso, je industrijsko in biotehnološko lahko zelo zanimiva. Metagenomski način pridobivanja encimov sestoji iz več korakov (**Slika 1**). Najprej je na vrsti vzorčenje ter izolacija in čiščenje metagenomske DNK iz vzorca. Sledi priprava metagenomske knjižnice z izbiro primernega vektorja in gostiteljskega organizma. Nazadnje se lotimo

iskanja zaželene lastnosti v metagenomski knjižnici s presejalnimi testi ali z določanjem zaporedja (Daniel, 2002). Verjetnost, da bomo na zgoraj opisani način identificirali določen gen, je odvisna od več dejavnikov, ki so med seboj tesno povezani: izbira vektorja in gostitelja, učinkovitost heterolognega genskega izražanja v gostiteljski celici, dolžina tarčnega gena, številčnost tarčnega gena v metagenomu in izbira metode identifikacije (Uchiyama in Miyazaki, 2009).



**Slika 1:** Shematični pregled priprave metagenomske knjižnice iz različnih ekosistemov in analiza le-teh na osnovi funkcije ali zaporedja (Sleator in sod., 2008: 362).

#### **2.4.1 Izolacija in priprava metagenomske DNK na kloniranje**

DNK iz vzorca je treba izolirati tako, da pridobimo čim več nukleinske kisline s čim manj nečistočami, ki bi lahko vplivale na učinkovitost kloniranja (Kakirde in sod., 2010). Ekstrakcije in čiščenja DNK iz okolja se lahko lotimo na dva načina. Prvi je neposredna izolacija DNK. Ta pristop temelji na lizi mikrobnih celic v vzorcu, sledi pa ji ločevanje DNK od ostankov celic in vsebine vzorca. Pri posredni metodi pa se iz vzorca najprej izolirajo celice in nato sledi ekstrakcija DNK z lizo celic. Raziskave, ki se ukvarjajo z vprašanjem, katera od metod je boljša, kažejo v prid posredni metodi. S tem pristopom naj bi sicer pridobili manj skupne DNK iz okolja kot v primeru neposredne metode, a gre toliko večjo količino pripisati predvsem evkariontski DNK, ki je z neposredno metodo izoliramo kar 61–93 %. Poleg tega, da s posredno metodo torej izoliramo manj evkariontske DNK (< 8 %), pa je sama raznolikost izolirane DNK večja kot v primerjavi z neposrednim pristopom. Kljub vsem prednostim posrednih metod pa je primernost le-te najbolj odvisna od samega okolja, ki ga vzorčimo (Gabor in sod., 2003). Pred izolacijo lahko uporabimo tudi obogatitvene tehnike, ki omogočajo povečanje števila mikroorganizmov z zaželenimi fenotipi in posledično tudi ustreznimi tarčnimi geni iz katerih nato pridobimo nukleinske kisline. DNK po ekstrakciji in čiščenju obdelamo mehansko ali z restrikcijскими encimi, da pridobimo inserte primerne dolžine (Kakirde in sod., 2010).

Dolžina insertov za kloniranje je odvisna od dolžine tarčnih genov. Če želimo identificirati genske produkte, katerih zapis leži, tako kot večina encimov ali zapisov za odpornost proti antibiotikom, na relativno malem genetskem lokusu, je dovolj, da pripravimo metagenomsko knjižnico z inserti do 10 kbp (Parsley in sod., 2010). V primeru, da je naš cilj pridobiti rekombinantne seve, ki bi vsebovali nepoškodovane poti biosinteze, vključene v nastanek protimikrobnih spojin, multiplih encimov s katabolno aktivnostjo ali operonov, ki kodirajo druge kompleksne metabolne funkcije, pa pripravimo velike metagenomske knjižnice, katerih inserti so daljši od 20 kbp (Kakirde in sod., 2010).

#### 2.4.2 Izbira vektorja in gostiteljskega organizma ter priprava metagenomske knjižnice

Vektor za pripravo metagenomskih knjižnic si izberemo glede na dolžino inserta. V primeru inserta, krajšega od 10 kbp, je najbolj primerna izbira plazmidni vektor. Če so inserti daljši (30 kbp do 40 kbp), je bolje izbrati kozmide ali fozmide. Vektorji BAC pa imajo lahko fragmente DNK, dolge tudi več 100 kbp. Plazmidni vektor mora vsebovati promotor za transkripcijo kloniranega inserta in mora biti kompatibilen z gostiteljem, izbranim za presejalne teste. Sledi izbira gostitelja. *E. coli* je že dobro uveljavljen gostitelj in tudi večina komercialnih vektorjev je prilagojena omenjeni bakteriji (Kakirde in sod., 2010). Prednost uporabe *E. coli* je v tem, da je ta organizem dobro raziskan, enostavno se transformira in je pogosto vključen v industrijskih fermentacijah (Daniel, 2002). Kljub vsem pozitivnim lastnostim omenjene bakterije pa ima le-ta omejeno sposobnost izražanja metagenomske DNK ter hkrati majhno frekvenco odkrivanja pozitivnih rekombinantnih sevov (< 0,01 %). Pred kratkim so Gabor in sod. (2004) statistično preverjali učinkovitost izražanja genov v *E. coli* in ugotovili, da bi lahko detektirali največ 40 % genov neke metagenomske DNK. To odkritje lahko pripišemo dejstvu, da nekateri geni za izražanje potrebujejo določene faktorje transkripcije in lastnosti gostiteljskega organizma, ki pa jih v *E. coli* ni. Tako je na primer pomembno, da gostitelj zazna promotorsko regijo tujega gena, da uporablja določene kodone za translacijo, da ima določene posttranslacijske mehanizme, ki naredijo protein funkcionalen, ter da ima potrebne mehanizme za sekrecijo tujih ekstracelularnih genskih produktov. Zato sta potrebna razvoj in uporaba novih in drugačnih gostiteljev, ki omogočajo odkrivanje večjega števila genov in operonov. Upoštevati in razmisliti moramo tudi o zmožnosti podvojevanja vektorja v gostitelju (Kakirde in sod., 2010).

Streit in Schmitz (2004) opisujeta uporabo *Streptomyces lividans* (Courtois in sod., 2003) za identifikacijo novih antibiotikov ter razvoj drugih, po Gramu negativnih gostiteljev, ki naj bi močno povečali učinkovitost odkrivanja novih genskih produktov. Za detekcijo bioaktivnih spojin pa so uporabili tudi druge alternativne gostitelje, kot so *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Putida*, *Ralstonia metallidurans* in bakterije iz rodu *Bacillus* (Singh in sod., 2009; Rondon in sod., 1999). Raziskave kažejo tudi v smer

genskih modifikacij, da bi povečali funkcijsko izražanje tujih genov v uveljavljenih gostiteljih (*E. coli*). Obstaja tudi možnost, da inserte kloniramo v prenosljive (*angl.* shuttle) vektorje, ki jih najprej transformiramo v *E. coli*, nato pa s konjugacijo prenesemo v druge gostitelje, kot je na primer zgoraj omenjena aktinomiceta *S. Lividans*, in izvedemo presejalne teste. Zelo pogosto raziskovalci v metagenomskih študijah odkrijejo drugačne pozitivne rekombinantne seve, ko istočasno uporabijo več različnih gostiteljev (Martinez in sod., 2004).

Knjižnico pripravimo z ligacijo vektorja in insertov primerne dolžine. Sledi transformacija v kompetentne gostiteljske celice in selekcija transformant. Rekombinantne celice nato namnožimo na agarških ploščah. Kvaliteto knjižnice določimo tako, da izračunamo odstotek gostiteljskih celic, ki vsebujejo vektor z insertom, in določimo povprečno dolžino insertov (Daniel, 2002). Kako velika naj bi knjižnica bila, je odvisno od več dejavnikov, in sicer od dolžine želenega tarčnega gena do organizma, za katerega predvidevamo, da ima zapis za tarčni gen. Če kot primer vzamemo metagenom tal, ki je lahko dom več 1000 bakterijskim vrstam, in kot povprečno dolžino genoma upoštevamo 4 Mbp, potem bi knjižnica, ki bi predstavljala celoten metagenom, morala biti velika  $4,6 \times 10^{10}$  bp. Vsebovala bi  $10^7$  plazmidnih (5 kbp inserti) ali skoraj  $10^6$  BAC (100 kbp inserti) rekombinantnih sevov (Handelsman in sod., 1998). Te številke temeljijo na idealizirani predpostavki, da so vse bakterijske vrste enakopravno zastopane tako v izolirani metagenomski DNK kot v ustrezni knjižnici. Če bi bil naš cilj imeti celoten naravno prisoten metagenom v knjižnici, potem bi se potrebna velikost knjižnice drastično povečala (Lorenz in Schleper, 2002). Riesenfeld in sod. (2004) so predpostavili, da bi morala knjižnica, ki bi zajela tudi redke taksonomske skupine, prisotne v tleh, vsebovati kar  $10^{11}$  BAC rekombinantnih sevov. Novejše raziskave pa kažejo, da podobno velja tudi za metagenom prebavnega trakta. Feng in sod. (2007) so izračunali, da bi, ob podobnih predpostavkah glede velikosti povprečnega genoma in samo 375 filotipih, odkritih v prašičjem prebavnem traktu z omejenim kloniranjem in sekvenciranjem majhnih knjižnic, metagenom v kunčjem slepem črevesu obsegal  $1,5 \times 10^9$  bp. Z upoštevanjem novejših podatkov iz pirosekvenciranja bi se te ocene nedvomno približale ocenam tal.

### 2.4.3 Analiza metagenomske knjižnice

Metagenomsko knjižnico lahko analiziramo na osnovi funkcije ali pa na osnovi zaporedja. Glede na tip knjižnice in zelene aktivnosti, ki jih iščemo, ter glede na čas in sredstva, ki jih imamo na voljo, se odločimo za primeren pristop. Analiza na osnovi funkcije vključuje presejalne teste za zaznavanje izražene lastnosti, ki jo je gostitelj pridobil z rekombinantno DNK. Tako na gojišču s specifičnim substratom zaznamo rekombinantne seve, ki imajo nov fenotip (Kakirde in sod., 2010). Za detekcijo *E. coli* s celulazno aktivnostjo na primer lahko uporabimo petrijevke z gojiščem LB, ki mu je dodana celuloza (CMC). Rekombinante *E. coli*, ki izražajo zelene gene, zaznamo po prelivanju petrijevok z lugolom že po petih minutah, ko s prostim očesom opazimo cono zbitritve okoli kolonije (Kasana in sod., 2008). Analiza metagenomske knjižnice na osnovi funkcije je zelo močno orodje pri odkrivanju novih naravnih produktov ali metabolnih aktivnosti iz organizmov, ki jih še ne znamo gojiti, a je pogosto odvisna od uspešne transkripcije in translacije gena, zvijanja proteinov in sekrecije iz gostiteljskega organizma (Kakirde in sod., 2010). Tudi če je gen izražen, je lahko stopnja ekspresije tako nizka, da ga je s funkcionalno analizo nemogoče odkriti (Steele in sod., 2008). Frekvenca odkrivanja novih biokatalizatorjev iz metagenomskih knjižnic je običajno nizka (**Preglednica 1**), zato so se kot najbolj učinkovit način za detekcijo funkcije izkazali visoko zmogljivostni presejalni testi, ki vključujejo avtomatizirano (robotsko) pregledovanje velikega števila (do 30.000 rekombinantnih sevov/dan) rekombinantnih sevov (Daniel, 2002).



**Preglednica 1:** Več primerov funkcijske analize metagenomskih knjižnic za nove biomolekule iz različnih ekosistemov (Mocali in Benedetti, 2010: 499; Uchiyama in Miyazaki, 2009: 617).

Biomolekula	Vektor	Povprečna dolžina inserta (kbp)	Št. testiranih rekombinant	Velikost knjižnice (Mbp)	Št. + rekombinant	Št. + rekombinant/velikost knjižnice
Esteraza/lipaza	Plazmid	6	286.000	1716	3	1/572
Esteraza/lipaza	Plazmid	6	730.000	4380	1	1/4380
Esteraza/lipaza	BAC	27	3648	100	2	1/50
Oksidacija poliolov	Plazmid	3	900.000	2700	15	1/180
Oksidacijski encimi	Kozmid	25	10.000.000	400.000	25	1/16.000
Alko. oksidoredukt.	Plazmid	4	400.000	1600	10	1/160
Amidaza	Plazmid	5	193.000	965	7	1/138
Amilaza	BAC	27	3648	100	8	1/12
Produkcija biotina	Kozmid	35	50.000	1750	7	1/250
Proteaza	Plazmid	10	100.000	1000	1	1/100
β-Laktamaza	Plazmid	5	80.000	400	4	1/100
Celulaza	Kozmid	22	1700	37	8	1/5
Antibiotik	Fozmid	35,6	100.000	3560	13	1/274
Antibiotik	BAC	63	12.000	756	4	1/189
Antibiotik	BAC	44,5	24.546	1092	3	1/364
Ksilanaza	Plazmid	8,5	24.000	204	1	1/204
DNK Polimeraza I	Plazmid	4	230.000	920	230	1/4
DNK Polimeraza I	Fozmid	36	4000	144	20	1/7,2
Celulaza	Kozmid	35,1	32.500	1141	11	1/103,7
Odpornost na nikelj	Plazmid	2,5	726.500	1816	13	1/139,7

Drugi pristop k analizi metagenomske DNK temelji na podlagi nukleotidnega zaporedja. Prva možnost je priprava degeneriranih oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi v knjižnici podvojimo iskane gene in jih nato sekvenciramo in analiziramo z računalniškimi orodji. Tako ni treba izvajati obsežnih in zamudnih presejalnih fizioloških testov. Lahko pa se izognemo tudi veliki večini laboratorijskega dela (kloniranje) s tem, da zaporedja sekvenciramo že takoj po izolaciji DNK (Kakirde in sod., 2010). Vendar na ta način pridobimo samo tiste sekvence genov, ki so homologna zaporedju sonde oziroma oligonukleotidnih začetnikov. Tako ne moremo zaznati novih encimov oziroma njihovih nukleotidnih zapisov, ki jih v podatkovnih bazah (še) ni (Uchiyama in Miyazaki, 2009). Obe metodi imata svoje prednosti in slabosti. Tako analiza, ki temelji na funkciji, omogoča identifikacijo novih zanimivih genov, ki jih na podlagi zaporedja ne bi mogli odkriti. Po drugi strani pa z analizo knjižnice na osnovi zaporedja lahko identificiramo zaporedja, ki sicer ne bi bila izražena v gostitelju. Za napredovanje na področju odkrivanja novih funkcionalnih genov je tako potrebna kombinacija obeh metod presejalnih testov (Riesenfeld in sod., 2004).

## 2.5 UPORABA ENCIMOV

Kompleksen mikrobiom kunčjega slepega črevesa deluje kot učinkovit sistem za pretvorbo rastlinske biomase v mikrobne proteine, sladkorje, kratkoverižne maščobne kisline in pline. Kot tak je odličen vir encimov, ki bi jih v industriji in biotehnologiji s pridom lahko izkoriščali (Brulc in sod., 2009). Že zelo dolgo encimi igrajo pomembno vlogo v kemijskih reakcijah, ki potekajo pri peki kruha, varjenju piva in izdelavi sira. Biokatalizatorji reakcij ustvarjajo manj odpadnih snovi in omogočajo izvajanje industrijskih procesov v milejših razmerah. So torej okolju prijazna alternativa v primerjavi s klasičnimi kemijskimi katalizatorji (Schwienhorst, 2002). Uporabljajo se v prehrambeni, tekstilni, kozmetični in papirni industriji, v gospodinstvu, kmetijstvu, medicini in znanosti.

Glede na to, da smo ljudje vedno bolj ozaveščeni o kratkoročnih in dolgoročnih posledicah uporabe kemičnih katalizatorjev, se vodilni znanstveniki čedalje bolj osredotočajo na t. i. zeleno kemijo. Pri slednji gre za razvoj koncepta uporabe biokatalizatorjev, celih mikroorganizmov ali samo encimov (bela biotehnologija) v smislu okolju prijaznih procesov, proizvodnje obnovljivih in čistih virov energije ter remediacijo toksičnih spojin iz okolja. Nedavne študije odkrivanja novih okolju prijaznih procesov, pri katerih ne bi bila potrebna uporaba kemikalij, si pomagajo z uporabo modernih molekularnih orodij, proteinskega inženiringa, metagenomike ter proteomike. Hkrati se osredotočajo tudi na znižanje stroškov proizvodnje ter povečanje donosa in učinkovitosti (Alcalde in sod., 2006).

### 2.5.1 Čista energija

Primer zelene kemije so biogoriva, ki so v zadnjih letih pritegnila veliko pozornosti kot alternativen in obnovljiv vir energije predvsem zaradi vse večjega pomanjkanja fosilnih goriv, naše odvisnosti od le-teh ter naraščajoče ozaveščenosti o posledicah njihove uporabe. Že nekaj časa raziskovalci rastlinsko biomaso obravnavajo kot alternativo za proizvodnjo biogoriv. Ustrezni encimi razgrajujejo kompleksno celično steno rastlin in produkti razgradnje so fermentabilni sladkorji, ki se v procesu fermentacije lahko

pretvorijo v biogorivo. Da bi lahko biogoriva predstavljala konkurenco oziroma zamenjala fosilna goriva, morajo biti energetska, količinska in ekonomska učinkovita ter okolju prijazna, njihova proizvodnja pa mora biti cenovno ugodna. Nepopolno znanje o zgradbi celične stene in razgradnji le-te predstavlja oviro, ki jo moramo premagati, da bi bila proizvodnja in uporaba teh goriv konkurenčna fosilnim gorivom. Potrebni je veliko raziskav v smeri sestave celičnih sten pri rastlinah, encimske ter mikrobne hidrolize in/ali fermentacije rastlinske biomase, razvoja novih metabolnih poti in iskanja novih biokatalizatorjev (Li in sod., 2009).

Bioenergija danes predstavlja približno 15 % letošnje porabe energije na svetu in potreba po čistejših virih energije je vedno večja. Predvideva se, da bo čez 20 do 40 let možno učinkovito pretvarjati biomaso v zelena transportna goriva (MacLean in sod., 2000). Glede na encime in biomaso, uporabljeno pri proizvodnji, ločimo tri glavne skupine biogoriv. Predelava rastlinskega olja v metil- ali druge kratkoverižne estre v reakciji transesterifikacije z lipazami vodi v produkcijo biodizla. Drugo skupino predstavlja biovodik. Vodik je brez vonja, barve in okusa ter ni toksičen. Edin stranski produkt pri njegovem izgorevanju je voda. Pridobimo ga lahko, poleg ustaljenih postopkov pridobivanja iz vode, tudi iz biomase. Tako so s pomočjo *Rhodobacter spheroides* pridobili vodik z razgradnjo odpadnega sadja in zelenjave. Ta preces je trenutno v fazi laboratorijskega testiranja in izboljševanja. Večina znanstvenikov se osredotoča na uporabo hidrogenaz za proizvodnjo vodika iz odpadkov, vendar so za sedaj doprinosi premajhni, da bi lahko ta oblika energije zaživela v realnosti. Bioetanol pa je še tretja opcija, z njim namreč lahko nadomestimo naftna goriva ali ga uporabimo kot dodatek le-tem. V razvoju so alternativne tehnologije, ki s pomočjo encimov, kot so amilaze, glukoamilaze, invertaze, laktaze, celulaze in hemicelulaze, hidrolizirajo škrob, saharozo, laktozo, celulozo ali hemicelulozo v fermentabilne sladkorje. Ti se naprej fermentirajo s pomočjo bakterij ali kvasovk za produkcijo etanola. S tem se izognemo uporabi močnih kislin in toksičnim odpadnim produktom. Tako pridobimo obnovljiv vir energije iz odpadnih snovi, zmanjšamo škodljive avtomobilne ter tovarniške emisije in pripomoremo k čistejšemu okolju (Alcalde in sod., 2006).

### 2.5.2 Celulaze

Poleg biotehnoške aplikacije celulaz v proizvodnji biogoriv se lahko le-te uporabljajo tudi v tekstilni industriji ter industriji detergentov (Steele in sod., 2008). Dodajanje celulaz v detergente pripomore k odstranjevanju določenih vrst madežev, mehčanju in lepši barvi oblačil. Med nošenjem in pranjem se le-ta poškodujejo. Poškodbe so vidne na nivoju mikrometrov, vendar tudi do milimetrov. Prav celulaze naj bi odstranjevale poškodbe, ki svetlobo odbijajo drugače in spremenijo barvo, teksturo in obliko oblačila. Uporabljajo se tudi v končnih stopnjah priprave tekstila. Celulaze omogočajo t. i. postaran izgled oblačila, poudarijo barve, omehčajo oblačilo ali pa ga naredijo odpornejšega na muckanje in trganje. Pomembna je njihova koncentracija, saj prevelika količina lahko oblačila oziroma tkanino poškoduje (Aehle, 2004).

V prihodnosti bodo encimi igrali vedno bolj pomembno vlogo pri čiščenju madežev. Postajamo bolj ekološko osveščeni, zato je voda vse bolj dragocena surovina. Detergenti za pranje bodo v prihodnosti potrebovali manj časa, vode in energije za čiščenje, hkrati pa bodo bolj učinkoviti. Seveda se bo njihova sestava prilagajala potrebam potrošnikov in novim vrstam tkanin in posode. Encimi bodo najbolj pripomogli k večji učinkovitosti detergentov. Industrija bo iskala vedno boljše različice encimov, nove encime z zelenimi funkcijami in cenejše postopke pridelave encimov (Aehle, 2004).

### 2.5.3 Ksilanaze

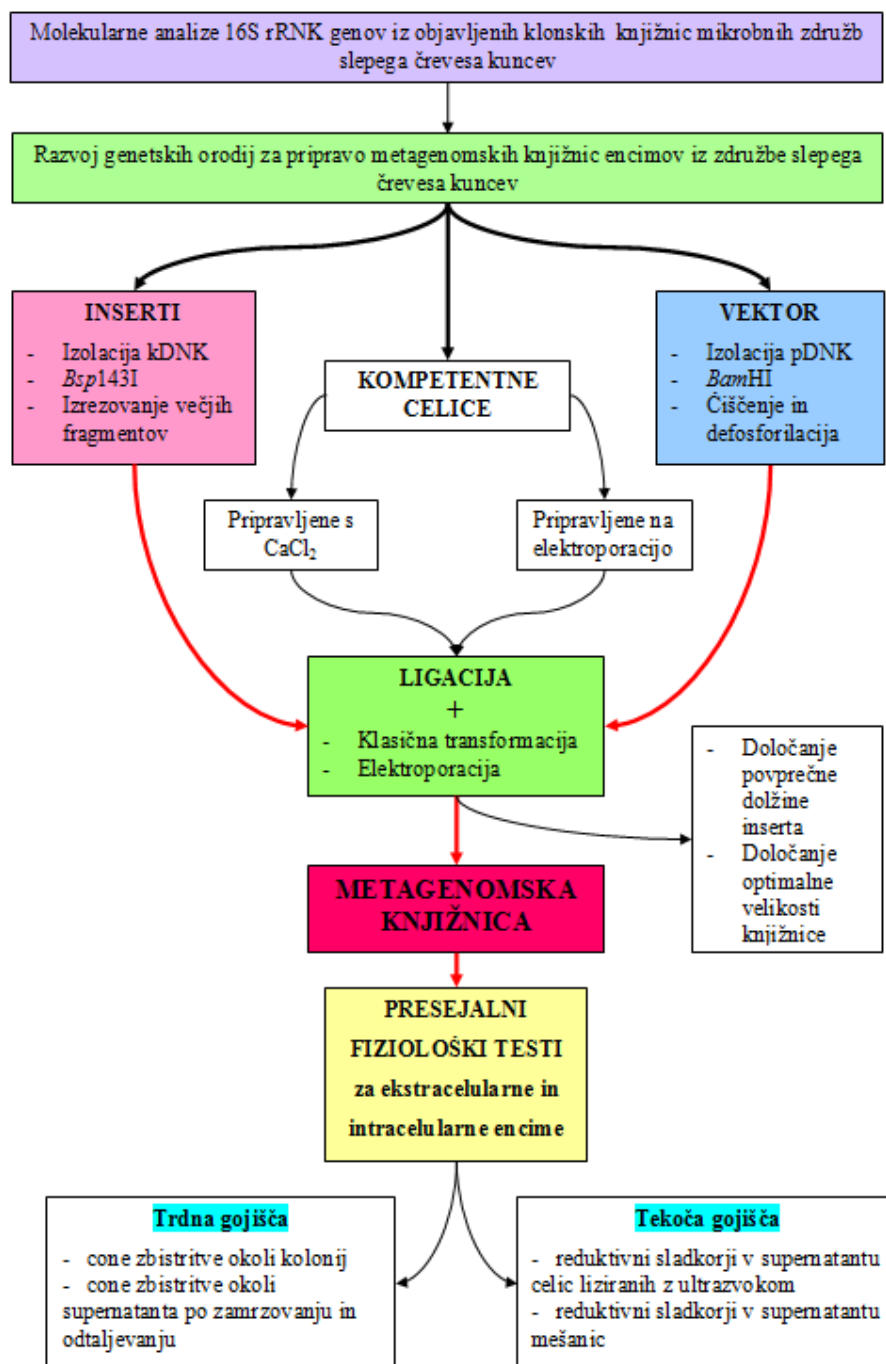
Ksilanaze so hidrolitični encimi, ki razgrajujejo ksilan, eno od sestavin rastlinske celične stene. Uporabljajo se tako v kmetijstvu in prehrabeni industriji kot tudi v tekstilni in papirni industriji (Steele in sod., 2008). Že starodavni Egipčani so pri peki kruha nevede uporabljali encime, naravno prisotne v moki, a šele v 20. stoletju smo moki namenoma začeli dodajati encime. Vanjo dodajamo tudi ksilanaze, natančneje endo-1,4- $\beta$ -ksilanaze, ki jo delajo bolj kvalitetno in polnovredno, z njimi nadzorujemo volumen in drobljivost končnega produkta in ga ohranjamo dlje časa svežega. Aplikacija encimov v kmetijstvu je že vsesplošno sprejeta. Uporaba je pogosta predvsem pri mokrem mletju koruze in kot

dodatek živalski krmi. V krmi je prisoten velik odstotek vlaknin. Nekatere živali (svinje, kokoši in druga perutnina) nimajo encimov, ki razgrajujejo vlaknine. Tu nastopijo ksilanaze, ki se najpogosteje dodajajo krmi (Aehle, 2004).

Naravna genska raznolikost in kompleksnost, ki jo najdemo v različnih ekosistemih, je izjemna. Ponuja nam idealen neusahljiv vir novih procesov ter biokatalizatorjev, ki učinkovito razgrajujejo odporno rastlinsko biomaso v fermentabilne sladkorje za proizvodnjo biogoriv in drugih kemičnih dobrin (Li in sod., 2009). Encimi, pridobljeni z metagenomskim pristopom, nam lahko omogočajo dostop do novih substratov in posledično do novih produktov, katerih sinteza ni mogoča z encimi, ki jih poznamo sedaj. Poleg tega pa lahko s pomočjo metagenomike odkrijemo biokatalizatorje, ki delujejo v ekstremnih razmerah (takšnih, pri katerih ne deluje noben do sedaj znan encim) in bi jih lahko uporabljali v mnogih industrijskih procesih (Steele in sod., 2008).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 2: Shematski prikaz poteka dela.

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Vzorec

Vzorec kunčjega slepega črevesa smo pridobili iz kunčje samice (uš. št. 76478), slovenske mesne linije SIKA (križanec belega novofundlandca in kalifornijca), ki je bila rejena na Biotehniški fakulteti, na Oddelku za zootehniko (Rodica). Od odstavitve in do usmrčitve (12. 3. 2009, stara 4 mesece, 2800 g) je bila samica krmljena s komercialnimi peleti (Jata Emona, Slovenija; 17 % CP, 14 % CF) *ad libitum*. Vzorci vsebine slepega črevesa so bili odvzeti v anaerobni komori Vinyl Anerobic Chamber (Coy Laboratories, ZDA) in shranjeni z zamrzovanjem na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Gojišča

#### a) Trdno gojišče Luria-Bertani (LB)

Za pripravo 1 l trdnega LB smo v primerno steklovino s tehtnico PN-163 (Mettler-Toledo, Švica) zatehtali:

- 10 g triptona,
- 10 g NaCl,
- 5 g kvasnega ekstrakta,
- 15 g agarja.

Dolili smo destilirano vodo do 1 l ter mešali na magnetnem mešalu Yellow line MSH basic (IKA, Nemčija) tako dolgo, da so se sestavine raztopile. Gojišče smo nato avtoklavirali v avtoklavu A-21CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija). Po avtoklaviranju smo počakali, da se malo ohladi, po potrebi dodali antibiotik ali IPTG in ga razlili v petrijevke. Plošče z gojiščem smo posušili v laminariju (Scholzen Technik, Švica) in jih shranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

b) Tekoče gojišče Luria-Bertani (LB)

Za pripravo 1 l tekočega LB smo v primerno steklovino zatehtali:

- 10 g triptona,
- 10 g NaCl,
- 5 g kvasnega ekstrakta.

Dolili smo destilirano vodo do 1 l ter mešali na magnetnem mešalu tako dolgo, da so se sestavine raztopile. Gojišče smo avtoklavirali in počakali, da se ohladi. Po potrebi smo dodali antibiotik.

c) Tekoč pufer Luria-Bertani (LB) za zamrzovanje

Za pripravo 1 l tekočega LB za zamrzovanje smo v primerno steklovino zatehtali:

- 10 g triptona,
- 5 g kvasnega ekstrakta,
- 10 g NaCl,
- 6,3 g  $K_2HPO_4$ ,
- 1,8 g  $KH_2PO_4$ ,
- 0,5 g  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ ,
- 1 g  $MgSO_4 \times 7H_2O$ ,
- 0,9 g  $(NH_4)_2SO_4$ ,
- 44 ml 100 % glicerol,
- do 1000 ml destilirane vode.

Sestavine smo postopoma raztopili v 1 l LB. Odmerili smo 95,6 ml raztopine v svežo stekleničko in dodali 4,4 ml glicerola. Dobro smo premešali, s pH metrom Orion 520A (Thermo Scientific, ZDA) gojišču zagotovili pH 7,5 in ga avtoklavirali. Po potrebi smo ohlajenemu gojišču dodali antibiotik.

d) Gojišče za presejalne fiziološke teste

Za pripravo 1 l trdnega LB smo v primerno steklovino zatehtali:

- 10 g triptona,
- 10 g NaCl,
- 5 g kvasnega ekstrakta,
- 15 g agarja,
- 6 g ksilana/ CMC/ mleka v prahu.



Dolili smo destilirano vodo do 1 l ter mešali na magnetnem mešalu tako dolgo, da so se sestavine raztopile. Gojišče smo nato avtoklavirali in počakali, da se malo ohladi, po potrebi dodali antibiotik ali IPTG in ga razlili v petrijevke. Plošče z gojiščem smo posušili v laminariju in jih shranili pri 4 °C.

### 3.2.3 Raztopine in kemikalije

Pri delu smo uporabili raztopine in kemikalije, navedene v **Preglednici 2**.

**Preglednica 2:** Seznam pri delu uporabljenih raztopin in kemikalij.

Kemikalija	Proizvajalec	Država porekla
IPTG	Fermentas	Nemčija
X-gal	Fermentas	Nemčija
Trypton	Biolife	Italija
NaCl	Merck KgaA	Nemčija
Kvasni ekstrakt	Biolife	Italija
Agar Bacteriological	Biolife	Italija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KgaA	Nemčija
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck KgaA	Nemčija
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Merck KgaA	Nemčija
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kemika	Hrvaška
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Kemika	Hrvaška
Glicerol (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich	ZDA
1 kb lestvica	Fermentas	Nemčija
Streptomycin	Fermentas	Nemčija
Ampicilin	Fermentas	Nemčija
Izopropanol	Merck KgaA	Nemčija
Kloroform	Merck KgaA	Nemčija
Fenol	Sigma-Aldrich	ZDA
PAHBAH	Sigma-Aldrich	ZDA
Agaroz (Seakem LE Agarose)	Cambrex	ZDA

### 3.2.4 Genotip gostitelja

Za gostitelja smo izbrali *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, ZDA). Genotip je sledeč:

**TOP 10** F– *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 deoR*  
*araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>r</sup>) *endA1 nupG*

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Analiza mikrobne združbe v slepem črevesu

Za potrebe analize mikrobne populacije kunčjega slepega črevesa smo na spletni strani NCBI (NCBI, 2010) v podatkovni zbirki GeneBank (Benson in sod., 2008) poiskali nukleotidne sekvence 16S rRNK knjižnic, ki so jih objavili Abecia in sod. (2005) ter Monteils in sod. (2008). Na voljo smo imeli tudi še neobjavljene sekvence iz študije Fanedl in sod. (2009). S pomočjo internetnega orodja RDP Classifier (Wang in sod., 2007) za analizo 16S rRNK, ki ga najdemo na spletni strani Ribosomal Database Project (RDP, 2010), smo določili taksonomsko hierarhijo vseh treh knjižnic in jih nato z orodjem Library Compare, dostopnim na isti spletni strani, med seboj tudi primerjali.

#### 3.3.2 Priprava insertov

##### 3.3.2.1 Izolacija DNK

DNK iz kunčjega slepega črevesa smo izolirali v laminariju. Vzorec smo najprej redčili v 10 mM pufru TE (pH 8,5). Sledilo je spiranje celic v TE pufru s centrifugiranjem v mali centrifugi Mini Spin Plus (Eppendorf, Nemčija) pri  $4000 \times g$ . Celice smo sprali dvakrat in odstranili supernatant. Nato smo jih resuspendirali v 567  $\mu$ l 10 mM pufra TE in dodali EDTA do 10 mM. Vsebino mikrocentrifugirke smo rahlo premešali in suspenziji dodali 3  $\mu$ l proteinaze K (20 mg/ml) ter 30  $\mu$ l 10 % SDS. Suspenzijo smo močno premešali ter v termobloku CH-100 (BioSan, Latvija) inkubirali 60 min pri 50 °C. Dodali smo 100  $\mu$ l 5 M NaCl in premešali, nato še 80  $\mu$ l 10 % CTAB v 0,7 % NaCl, segretega na 65 °C. Suspenzijo smo premešali in inkubirali 10 min pri 65 °C. Sledila je ekstrakcija v enakem volumnu kloroforma. Mešanico smo premešali in centrifugirali 10 min pri  $8000 \times g$ . Zgornjo fazo smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in dodali isti volumen fenola. Mešanico smo premešali in centrifugirali. Zgornjo fazo smo prenesli v novo centrifugirko in dodali 0,6 volumna izopropanola. Mešanico smo premešali in centrifugirali pri  $14.000 \times g$ . Po centrifugiranju smo iz mikrocentrifugirke odstranili supernatant in sprali

usedlino ter stene z 1 ml ledeno hladnega etanola. Nato smo centrifugirali 10 min pri  $14.000 \times g$  in odstranili supernatant. Nukleinsko kislino smo posušili na sobni temperaturi in raztopili v 20  $\mu\text{l}$  10 mM TE. Po potrebi smo dodali še RNazo (1  $\mu\text{l}$  na 200  $\mu\text{l}$  raztopljenе nukleinske kisline). DNK smo shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Količino in kvaliteto izolirane DNK smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 0,8 % agarozni gel, in sicer tako, da smo s segrevanjem v 40 ml 0,5-kratnega pufra TBE raztopili 0,32 g agaroze in jo razlili v zatesnjen nosilec s primernim glavnikom ter počakali, da se je gel strdil. Zatem smo v elektroforetsko banjico Mini Sub Cell GT oziroma Wide Mini Sub Cell GT (Bio-Rad, ZDA) nalili toliko 0,5-kratnega TBE, da je bil gel prelit. Pred nanosom v žepke gela smo vzorec obarvali in obtežili z nanašalnim pufrom in uporabili 1 kb lestvico kot marker, ki vsebuje DNK fragmente naslednjih dolžin: 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp ter 10.000 bp. Elektroforeza PowerPac (Bio-Rad, ZDA) je potekala 60 min pri 100 V. Gelčke smo 10 min barvali v raztopini etidijevеga bromida v destilirani vodi ter 10 min razbarvali v destilirani vodi. Slikali smo jih v komori s kamero za slikanje glečkov Gel Doc 1000 (Bio-Rad, ZDA) pod UV lučjo pri valovni dolžini 254 nm in fotografije urejali s programom Molecular Analyst Software 1.5 (Bio-Rad, ZDA).

### 3.3.2.3 Delna restrikcija

Kromosomsko DNK iz vzorca smo cepili z restriksijskim encimom *Bsp143I* (Fermentas, Nemčija), da smo dobili inserte primerne dolžine. Pripravili smo si dve mikrocentrifugirki, saj smo iste reakcijske mešanice inkubirali različno dolgo ter dodali 25,5  $\mu\text{l}$  DNK, 3  $\mu\text{l}$  10-kratnega pufra Buffer *Bsp143I* in 1,5  $\mu\text{l}$  encima *Bsp143I* do končnega volumna 30  $\mu\text{l}$ . Mikrocentrifugirke so bile ves čas na ledu. Ko so bile vse sestavine v mikrocentrifugirki, smo s pipeto premešali vsebino in na hitro centrifugirali ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10.000 \times g$ , »short spin«). Sledila je inkubacija v vodni kopeli na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 30 in 35 min. Po inkubaciji smo dodali

EDTA do 10 mM in dobro premešali. Uspešnost delne restrikcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (0,8 % gel) in sicer tako, da smo cepljeno DNK primerjali z necepljeno, ki je predstavljala kontrolo.

#### 3.3.2.4 Priprava insertov na ligacijo

Za pridobivanje daljših insertov oziroma fragmentov kromosomske DNK smo iz gela izrezali fragmente, ki so daljši od 5 kbp. Gel smo pripravili po že opisanem postopku. Po slikanju gela nismo zavrgli, temveč smo ga položili na prozorno mapo, znotraj katere je bila slika gela iste velikosti kot gel sam. Tako smo glede na sliko s skalpelom, izrezali koščke gela, kjer so fragmenti večji od 5 kbp. Po cepitvi smo gel še enkrat pogledali v Gel Doc 1000 komori in preverili, ali je bila cepitev uspešna. DNK smo očistili nečistoč s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (QIAGEN, 2008). Najprej smo stehali 2 ml-mikrocentrifugirke in vanje dali koščke izrezane DNK. Dodali smo 3 volumne pufru Buffer QG na 1 volumen gela. Sledila je 10-minutna inkubacija pri 50 °C z občasnim mešanjem na vrtinčnem mešalu Vortex-Genie 2 (Scientific industries Inc., ZDA). Po inkubaciji smo v mešanico dodali 1 volumen izopropanola in premešali. Vsebino mikrocentrifugirke smo prenesli v QIAquick kolono in centrifugirali 1 min pri  $17.900 \times g$ . Za čiščenje smo v kolono dali 0,75 ml pufru Buffer PE in centrifugirali 1 min. Centrifugiranje smo ponovili še enkrat. QIAquick kolono smo prenesli v čisto 1,5 ml mikrocentrifugirko in za spiranje dodali 30 do 50  $\mu$ L pufru Buffer EB ter centrifugirali 1 min. Nato smo tako očiščeno DNK spet preverili z agarozno gelsko elektroforezo (0,8 % gel).

### 3.3.3 Priprava vektorja

#### 3.3.3.1 Izolacija plazmidne DNK

Za vektor smo izbrali plazmid pUC19 (Invitrogen, ZDA). Čez noč smo v stresalniku RVI-403 (Tehtnica Železniki, Slovenija) v 4 ml tekočega gojišča LB z ampicilinom na 37 °C in pri 200 obratih/min namnožili *E. coli* TOP 10, transformirano z zgoraj omenjenim

plazmidom. Štiri ml prekonočne kulture smo nato prenesli v mikrocentrifugirke in večkrat centrifugirali, da smo dobili potrebno gostoto celic. Izolacijo smo izvedli v laminariju s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche, 2004). Pelet smo resuspendirali v 250  $\mu$ l pufru Suspension Buffer z dodano RNazo. Nato smo mešanici dodali 250  $\mu$ L pufru Lysis Buffer, nežno premešali in pri sobni temperaturi 5 min inkubirali. Lizirani raztopini smo dodali 350  $\mu$ l pufru Binding Buffer, nežno premešali in 5 min inkubirali na ledu. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri  $13.000 \times g$ . Supernatant smo prenesli v mikrocentrifugirko s filtrom in jo vstavili v zbiralno mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo 1 min. Celice smo odstranili tako, da smo dodali 700  $\mu$ l pufru Wash Buffer II in centrifugirali 2-krat po 1 min. DNK smo eluirali v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko z 100  $\mu$ l pufru Elution Buffer in centrifugirali 1 min. Eluirano plazmidno DNK smo shranili na  $-20^\circ\text{C}$ . Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (0,8 % gel).

### 3.3.3.2 Restrikcija

Plazmid pUC19 smo cepili z restriksijskim encimom *Bam*HI (Fermentas, Nemčija), da bi ga lahko uporabili kot vektor. Pripravili smo reakcijsko mešanico s 43  $\mu$ l plazmidne DNK, 5  $\mu$ l 10-kratnega pufru Buffer *Bam*HI in 1,5  $\mu$ l restriksijskega encima *Bam*HI. Mikrocentrifugirke so bile ves čas na ledu. Ko so bile vse sestavine v mikrocentrifugirki, smo s pipeto premešali vsebino in na hitro («short spin») centrifugirali v veliki centrifugi Mikro 200R (Hettich zentrifugen, Nemčija) pri  $0^\circ\text{C}$  in  $10.000 \times g$ . Sledila je inkubacija v vodni kopeli WB-13 (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) za 60 min na  $37^\circ\text{C}$ . Po 60-minutni inkubaciji smo spet dodali 1,5  $\mu$ l encima ter inkubirali 2 h v vodni kopeli na  $37^\circ\text{C}$ . Cepljen plazmid smo shranili na  $-20^\circ\text{C}$ . Uspešnost restrikcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### 3.3.3.3 Priprava vektorja na ligacijo

Cepljen plazmid pUC19 smo očistili s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche, 2008). Najprej smo v mikrocentrifugirko dodali 500  $\mu$ l pufru Binding

Buffer in dobro premešali. Mešanico smo prenesli v mikrocentrifugirko s filtrom in jo vstavili v zbiralno mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo 1 min pri  $13.000 \times g$ . Odstranili smo tekočino v zbiralni mikrocentrifugirki, dodali 500  $\mu\text{l}$  pufra Wash Buffer in centrifugirali 1 min. Spet smo odstranili tekočino v zbiralni mikrocentrifugirki in dodali 200  $\mu\text{l}$  istega pufra. Filter smo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko, dodali 50  $\mu\text{l}$  pufra Elution Buffer ter centrifugirali 1 min. Nato smo ga zavrgli. Očiščen vektor smo shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Plazmid smo naknadno defosforilirali z alkalno fosfatazo. Pripravili smo reakcijsko mešanico, in sicer tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 62  $\mu\text{l}$  plazmidne DNK, 10  $\mu\text{l}$  10-kratnega pufra FastAP, 26  $\mu\text{l}$  vode brez nukleaz in 2  $\mu\text{l}$  encima FastAP. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 10 min pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakcijo smo zaustavili tako, da smo mešanico inkubirali 5 min pri  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vektor smo po končani defosforilaciji zopet očistili s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche, 2008) in uspešnost defosforilacije ter čiščenja preverili z agarozno gelsko elektroforezo (0,8 %).

### 3.3.4 Ligacija

Ligacijsko mešanico smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 1  $\mu\text{l}$  vektorja (20 ng DNK), 1  $\mu\text{l}$  insertov kromosomske DNK (katere 10  $\mu\text{l}$  je prikazanih na **Sliki 6**), 7  $\mu\text{l}$  10-kratnega pufra T4 DNA Ligase Buffer in 1  $\mu\text{l}$  ligaze T4 DNA Ligase (Fermentas, Nemčija). Vsebino mikrocentrifugirke smo dobro premešali in inkubirali 90 min na  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inaktivacija encima je potekala 10 min pri  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ligacijska mešanica je bila tako pripravljena za transformacijo.

#### 3.3.4.1 Priprava kemično kompetentnih celic

Nacepili smo kulturo *E. coli* TOP 10 na trdno gojišče LB s streptomycinom. Inkubirali smo v komori I-50 (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) čez noč na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Naslednji dan smo prenesli eno kolonijo v erlenmajerico s 100 ml tekočega LB z dodanim streptomycinom (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in inkubirali na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v stresalniku pri 250 obratih/min. En ml

prekonočne kulture TOP 10 smo prenesli v 100 ml svežega tekočega LB gojišča in stresali v stresalniku na 37 °C pri 250 obratih/min. Vsake pol ure smo merili optično gostoto pri 600 nm v spektrofotometru Jenway 6305 UV/VIS Spectrofotometer (Daigger, ZDA). Erlenmajerico smo postavili na led, ko je bila OD<sub>600</sub> blizu 0,4. Vsebino erlenmajerice smo prenesli v centrifugirke in centrifuriali 10 min pri 0 °C in 2700 × g v veliki centrifugi. Nato smo centrifugirke postavili na led, odstranili supernatant in resuspendirali pelet v 10 ml CaCl<sub>2</sub>. Zopet smo centrifugirali in odstranili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 2,353 ml CaCl<sub>2</sub> s 15 % glicerola ter mešanico razporedili v mikrocentrifugirke po 100 µl. Mikrocentrifugirke s kompetentnimi celicami smo shranili v zamrzovalniku na -70 °C.

#### 3.3.4.2 Priprava kompetentnih celic za elektroporacijo

Nacepili smo kulturo *E. coli* TOP 10 v 5 ml tekočega LB in inkubirali v stresalniku preko noči na 37 °C in 250 obratih/min. En ml prekonočne kulture smo naslednji dan prenesli v 100 ml tekočega LB z nizko vsebnostjo NaCl (0,1 g/100 ml) in kulturo inkubirali na 37 °C pri 300 obratih/min. Sproti smo merili optično gostoto pri 600 nm do vrednosti 0,6. Kulturo smo prenesli v centrifugirke in jih postavili na led za 15 min. Centrifugirali smo 5 min pri 3000 × g in 0 °C. Odlili smo supernatant in resuspendirali z mešanjem na ledu v 30 ml ledeno hladne sterilne vode. Centrifugirali smo 2 min pri 10.000 × g in 0 °C. Spiranje celic smo ponovili štirikrat. Odlili smo supernatant in celice raztopili v ostanku supernatanta z mešanjem na ledu. Vsebino centrifugirke smo razdelili v mikrocentrifugirke po 100 µl. Eno mikrocentrifugirko smo uporabili za merjenje upora, ostale smo zamrznili na -70 °C.

#### 3.3.4.3 Transformacija kemično kompetentnih celic

Sto µl kompetentnih celic smo dodali 10 µl ligacijske mešanice in nežno premešali. Suspenzijo smo 30 min inkubirali na ledu in nato 90 s na 42 °C. Spet smo mikrocentrifugirko inkubirali na ledu, in sicer 3 min. Dodali smo 400 µl LB in inkubirali 60 min na stresalniku pri 150 obratih/min in 37 °C. Po inkubaciji smo prenesli 200 µl kulture na trdno gojišče LB z ampicilinom (100 µg/ml) ter spojino X-gal (15 µg/ml) in

plošče čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo določili razmerje modro-belih kolonij in frekvenco transformacije.

#### 3.3.4.4 Elektroporacija

Preden smo se lotili transformacije z elektroporacijo, smo z dializo, ki je trajala 2 h, ligacijsko mešanico očistili soli. Dializo smo izvedli s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (New England BioLabs, 2002). V petrijevko smo nalili 30 ml dvakrat destilirane vode (miliQ) in na tekočino položili membrano/nitrocelulozni filter (premer filtra 25 mm, velikost por 0,025 µm; Millipore) tako, da je bila svetleča stran filtra obrnjena navzgor. Plavajoči filter smo pustili tako 5 min, da se je popolnoma prepojil z vodo. Nato smo na sredino filtra previdno odpipetirali ligacijsko mešanico (10 µl). Petrijevko smo pokrili in pustili, da dializa poteka 2 h. Po dializi smo s pomočjo pipete s filtra previdno zajeli ligacijsko mešanico in jo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko. Potem smo z rahlim mešanjem združili kompetentne celice za elektroporacijo (100 µl) in dializirano ligacijsko mešanico (10 µl) ter inkubirali 1 min na ledu. Elektroporacijsko mešanico smo prenesli v ohlajeno elektroporacijsko kiveto in izvedli elektroporacijo z elektroporacijskim sistemom Gene Pulser (Bio-Rad, ZDA) pri 2,5 kV in 25 µF. Celicam smo dodali 2 ml tekočega gojišča LB in inkubirali 1 h na 37 °C in 50 obratih/min. Kulture smo nacepili na trda gojišča LB, ki so vsebovala ampicilin (100 µg/ml) ter X-gal (15 µg/ml) in čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo določili razmerje modro-belih kolonij in frekvenco transformacije.

#### 3.3.4.5 Pregledovanje dolžine insertov

Nekaj belih kolonij smo prek noči inkubirali v 5 ml tekočega LB z ampicilinom na 37 °C ter 250 obratih/min. Iz prekončnih kultur smo izolirali plazmidno DNK s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche, 2004). Sledila je restrikcija plazmida z restrikcijским encimom FastDigest *PstI* (Fermentas, Nemčija). V restrikcijsko mešanico smo dodali 3 µl plazmida, 5 µl destilirane vode, 1 µl 10-kratnega pufra FastDigest Buffer ter 1 µl encima FastDigest *PstI*. Inkubirali smo 10 min pri 37 °C in



preverili uspešnost restrikcije z gelsko elektroforezo (0,8 % gel, 80 ml 0,5-kratnega TBE, 0,64 g agaroze). Gel smo nato analizirali z uporabo računalniškega programa GeneTools (SYNGENE, Velika Britanija).

#### 3.3.4.6 Določanje optimalne velikosti knjižnice za pridobitev rekombinantnega seva z želeno lastnostjo

Za izračun optimalne velikosti knjižnice oziroma števila rekombinantnih sevov, ki jih je treba imeti v knjižnici, da lahko zagotovimo, da se katerokoli zaporedje DNK iz vzorca nahaja v njej, uporabimo formulo (Wahl in sod., 1987):

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f) \quad \dots (1)$$

Kjer je: N – optimalna velikost knjižnice

P – verjetnost (izražena kot delež)

f – delež genoma v enem rekombinantnem sevu

Kot primer lahko izračunamo število rekombinantnih sevov, ki so potrebni, da se z 99 % verjetnostjo določena sekvenca DNK iz genoma *E. coli* nahaja v knjižnici, sestavljeni iz insertov dolgih 40 kbp:

$$N = \ln(1 - 0,99) / \ln(1 - (4 \times 10^4 \text{ bp} / 4,7 \times 10^6 \text{ bp})) = 461 \text{ rekombinantnih sevov}$$

#### 3.3.5 Presejalni fiziološki testi za preverjanje encimske aktivnosti

Metagenomsko knjižnico smo analizirali na osnovi funkcije. Odločili smo se za dva pristopa. Najprej smo pripravili klasične presejalne teste na trdnih in nato še v tekočih gojiščih za odkrivanje ekstracelularne in intracelularne encimske aktivnosti.

### 3.3.5.1 Presejalni testi na trdnih gojiščih

Bele kolonije smo s postopkom pikiranja prenesli na trdno gojišče LB z ampicilinom in IPTG ali v mikrotitrnske plošče s tekočim LB pufrom za zamrzovanje. Pustili smo, da se rekombinantni sevi namnožijo čez noč na 37 °C in 100 obratih/min ter jih odtisnili na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom, IPTG (do 0,1 mM) ter s substrati za ksilanaze, celulaze ali proteaze. Mikrotitrnske plošče smo shranili tako, da smo jih zamrznili (-20 °C), plošče pa pri 37 °C inkubirali 7 dni. Kolonije smo nato pregledovali za ksilanazne in celulazne encimske aktivnosti tako, da smo jih 5 do 15 min barvali z lugolom. Nekaj rekombinantnih sevov pa smo preverili tudi za proteazno aktivnost, in sicer tako, da smo plošče 10 min barvali z 1 M HCl. Iskali smo vidne cone razbarvanja okoli kolonij. Petrijevke smo dokumentirali z digitalnim fotoaparatom (Canon, Japonska).

Rekombinantne seve iz mikrotitrnske plošče s tekočim LB pufrom za zamrzovanje smo precepili v druge mikrotitrnske plošče z istim gojiščem ter jih zamrznili jih pri -70 °C in odtalili pri 50 °C. Ekstrakte smo prenesli na detekcijsko ploščo z dodanimi substrati ter jih 48 h inkubirali pri 37 °C. Kolonije smo nato pregledovali za ksilanazne in celulazne encimske aktivnosti tako, da smo jih 5 do 15 min barvali z lugolom. Iskali smo vidne cone razbarvanja okoli kolonij. Plošče smo dokumentirali z digitalnim fotoaparatom.

### 3.3.5.2 Presejalni testi v tekočih gojiščih

Rekombinantne seve shranjene v zamrznjenih mikrotitrnskih ploščah smo oživljali tako, da smo jih razporedili v očiščen laminarij s prižganim gorilnikom in ventilacijo. Precepili smo jih v dveh ponovitvah. Eno serijo smo ponovno zamrznili (-20 °C) za shranjevanje, drugo serijo pa smo prek noči inkubirali na 37 °C s stresanjem pri 100 obratih/min ter jih do uporabe shranili na 4 °C. Pred pipetiranjem smo vsebino plošč dobro premešali z mešalnikom mikrotitrnskih plošč Vibromiks 30 (Tehtnica Železniki, Slovenija) pri 150 obratih/min za 5 min. Iz luknjic v mikrotitrnskih ploščah smo sterilno odvzeli celotne volumne (150 µl) in jih prenesli v sterilno epruveto z zamaškom Falcon (BD, ZDA) ter vsebino dobro premešali na vrtinčnem mešalu. Tako smo dobili 14 ml mešanice vseh

rekombinantnih sevov z ene mikrotitrne plošče. Postopek smo ponovili še za ostalih 19 mikrotitrskih plošč. Celoten volumen ene epruvete z zamaškom Falcon smo alikvotirali in prvo polovico volumna mešanice rekombinantnih sevov 45 min razbijali v ledeni kopeli z ultrazvokom. Vhodna jakost ultrazvoka je znašala 220–230 V in 155 W, izhodna pa 70 W ter 42 kHz. Drugo polovico mešanice rekombinantnih sevov smo pustili intaktno. Sledil je test, s katerim smo določali aktivnost kloniranih zaporedij prek povišane koncentracije reduktivnih sladkorjev na račun razgradnje rastlinskih polimernih substratov. V posamezno luknjico v mikrotitrski plošči smo odpipetirali po 100  $\mu$ l mešanice rekombinantnih sevov, 50  $\mu$ l 0,05 % substrata (CMC, ksilan, škrob, laminarin, pektin, gelan in lichenan) z 0,001-odstotnim Na-azidom. Tako pripravljene mešanice rekombinantnih sevov smo 72 h inkubirali pri 37 °C. Prisotnosti reduktivnih sladkorjev po hidrolizi različnih polimerov smo kvalitativno sledili prek reagenta PAHBAH (Lever, 1977). Pripravili smo 50 ml reagenta PAHBAH, in sicer tako, da smo zmešali 2,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2,5 ml 0,8 M Na-citrata (pH 7,5) ter 2,5 ml 5 M NaOH. Dodali smo 30 ml destilirane vode in med mešanjem počasi dodali še 2,5 ml 0,2 M CaCl<sub>2</sub> in nato še 1 g PAHBAH. Na koncu smo dodali destilirano vodo do skupnega volumna 50 ml. Po 20  $\mu$ l posamezne mešanice rekombinantnih sevov z dodanimi substrati in *E. coli* brez insertov smo odpipetirali v mikrotitrne bloke Deep well (Thermo Fisher Scientific, ZDA) ter dodali 1 ml reagenta PAHBAH. Po 10 min inkubaciji pri 100 °C za razvijanje reakcije smo določili intenziteto rumene barve spektrofotometrično pri 415 nm. Iz rezultatov ponovitev *E. coli* brez insertov smo izračunali povprečje in 2-kratno standardno deviacijo. Vrednosti absorpcije, določene za raztopine rekombinantnih sevov, ki so bile večje od vsote 2-kratne standardne deviacije ter povprečja meritev za *E. coli* brez insertov, smo privzeli kot pozitivne.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ANALIZA MIKROBNE ZDRUŽBE V SLEPEM ČREVESU

Hipotezo, da prebavila kuncev predstavljajo primeren vir hidrolitičnih encimov lignoceluloze, smo preverili tako, da smo analizirali in med seboj primerjali 16S rRNK knjižnice, objavljene v podatkovnih zbirkah, ter eno neobjavljeno študijo o mikrobni populaciji v kunčjem slepem črevesu.

#### 4.1.1 Taksonomska uvrstitev

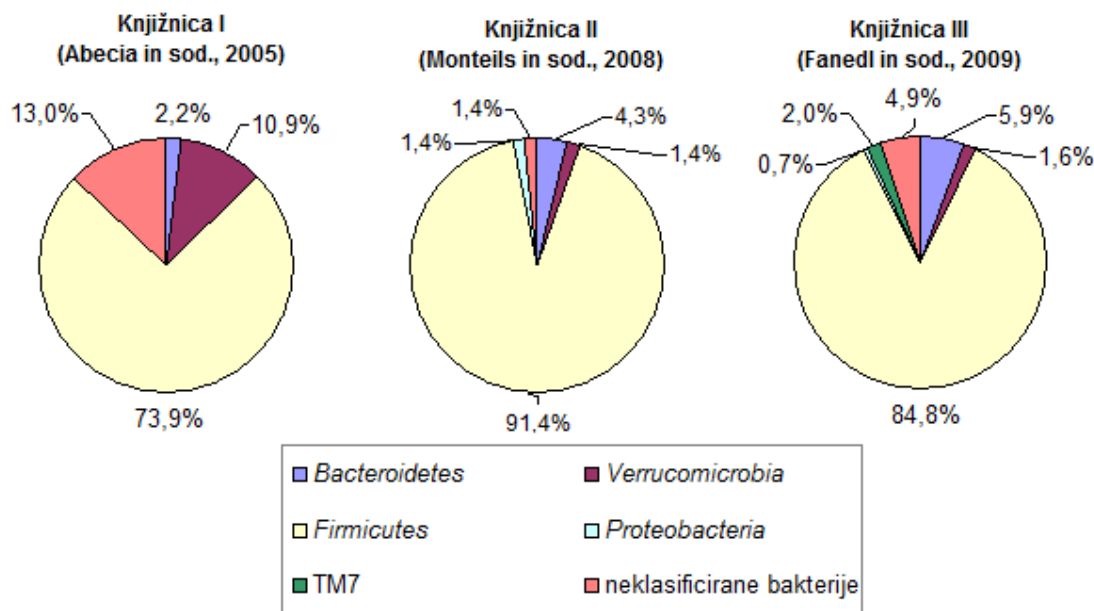
Abecia in sod. (2005) so z analizo 16S rRNK knjižnice dobili 46 sekvenc. Od tega se jih je 73,9 % uvrstilo v deblo *Firmicutes*, 10,9 % v deblo *Verrucomicrobia*, 2,2 % v deblo *Bacteroidetes* in ostalih 13 % med neklasificirane bakterije. Med slednje se je uvrstilo 6 sekvenc. Večina (60,6 %) firmikutov je spadala v družino *Lachnospiraceae*, od tega je vseh 21 sekvenc še neklasificiranih. Ena sekvenca firmikutov se je uvrstila med neklasificirane ruminokoke, 9 med neklasificirane klostridije, 2 pa v rod *Acetivibrio*. V deblo *Verrucomicrobia* so 3 sekvence spadale v rod *Akkermansia*, 2 pa med neklasificirane verukomikrobije. Deblo *Bacteroidetes* je zajela 1 sekvenca, ki se je uvrstila v neklasificirano družino *Porphyromonadaceae*.

Monteils in sod. (2008) so v podatkovno bazo GeneBank posredovali 70 sekvenc. Največji odstotek (91,4 %) jih je spadalo v deblo *Firmicutes*, 4,3 % v deblo *Bacteroidetes*, 1,4 % v deblo *Proteobacteria*, 1,4 % v deblo *Verrucomicrobia* in še zadnjih 1,4 % med neklasificirane bakterije (1 sekvenca). V deblo *Firmicutes* je bila najštevilčnejša družina *Ruminococcaceae* (57,7 %), z 29 % ji je sledila družina *Lachnospiraceae* in *Incertae Sedis XIII* s 1,6 %. Kar 9,7 % (6 sekvenc) je bilo neklasificiranih klostridijev. Zaporedje, ki se je uvrstilo v družino *Incertae Sedis XIII*, je spadalo v rod *Anaerovorax*. V družino *Lachnospiraceae* je spadalo 17 sekvenc, od tega je bilo ena iz rodu *Marvinbryantia*, ostala pa so spadala med neklasificirane *Lachnospiraceae*. V družino *Ruminococcaceae* so se uvrstili rodovi *Anaerotruncus* (1 sekvenca), *Subdoligranulum* (1

sekvenca), *Ruminococcus* (1 sekvenca), *Oscillibacter* (4 sekvence), *Acetivibrio* (8 sekvenc) in 22 sekvenc neklasificiranih ruminokokov. Deblo *Bacteroidetes* je z eno sekvenco predstavljalo rod *Butyricimonas*, ostali 2 sekvenci pa sta spadali med tiste, ki jih ni bilo mogoče natančneje uvrstiti. V deblo proteobakterij se je z 1 sekvenco uvrstil rod *Variovorax*, v deblo *Verrucomicrobia* pa rod *Akkermansia*.

Fanedl in sod. (2009) so v neobjavljeni študiji dobili 492 sekvenc. Kar 85 % bakterijskih sekvenc je spadalo v deblo *Firmicutes*, ostale pa so se porazporedile v debela *Bacteroidetes* (5,9 %), *Verrucomicrobia* (1,6 %), *Proteobacteria* (0,7 %) in TM7 (2 %). Triindvajset sekvenc ni imelo taksonomske uvrstitve. Večina (56,3 %) firmikutov je spadala v družino *Ruminococcaceae*, od tega 18 sekvenc v rod *Ruminococcus*, 13 sekvenc v *Acetivibrio*, 10 sekvenc v rod *Butyricoccus*, po 5 sekvenc v rodova *Oscillibacter* in *Anaerotruncus*, 2 sekvenci v rod *Subdoligranulum*, po ena sekvenca v rodova *Lactonifactor* in *Papillibacter*, največ (168 sekvenc) pa med neklasificirane ruminokoke. Ostalih 19 % firmikutov smo uvrstili v družino *Lachnospiraceae*, od katerih je 6 sekvenc spadalo v rod *Coprococcus*, 1 sekvenca v rod *Marvinbryantia* in 69 v še neklasificirane rodove. Majhen delež (0,8 %) firmikutov se je uvrstil v družino *Clostridiaceae* in rod *Clostridium* (3 sekvence). Med firmikuti pa se je znašlo tudi 5 sekvenc rodu *Bacillus* in 1 sekvenca rodov *Terribacillus*, *Staphylococcus*, *Allobaculum* in *Anaerovorax*. V družino neklasificiranih klostridijev je spadalo 23,8 % firmikutov. Od proteobakterij smo našli alfa-, beta- in gamaproteobakterije. Mednje so se uvrščali rodovi *Xanthobacter*, *Variovorax* (1 sekvenca) in *Escherichia/Shigella*. V deblo *Bacteroidetes* so se nahajali rodovi *Bacteroides* s 15 sekvencami, *Alistipes*, *Odoribacter*, *Butyricimonas* in 3 neklasificirane sekvence. Med verukomikrobiji smo naleteli na 7 sekvenc rodu *Akkermansia* in 2 neklasificirani sekvenci. V deblo TM7 se je uvrstilo 10 sekvenc. Majhnega odstotka (0,8 %) sekvenc iz te knjižnice pa nismo mogli uvrstiti v domeno bakterij. Vse 4 sekvence najverjetneje spadajo med arheje, a je odstotek sorodnosti zelo majhen (od 14 % do največ 46 %).

#### 4.1.2 Primerjava knjižnic



**Slika 3:** Grafični prikaz taksonomske primerjave knjižnic (Abecia in sod., 2005; Monteils in sod., 2008; Fanedl in sod., 2009) na nivoju debel.

Vse tri knjižnice smo primerjali med seboj, da bi ugotovili, kaj imajo skupnega in v čem se najbolj razlikujejo. Že iz slike (**Slika 3**) je razvidno, da je v vseh treh knjižnicah prevladovala skupina bakterij iz debela *Firmicutes*. Najštevilčnejši skupini sta bili neklasificirana družina *Lachnospiraceae* in *Ruminococcaceae*. V knjižnici I (Abecia in sod., 2005) je bilo več sekvenc iz družine neklasificiranih *Lachnospiraceae* (45,7 % oz. 21 sekvenc) kot neklasificiranih *Ruminococcaceae* (2,2 % oz. 1 sekvenc), v ostalih dveh knjižnicah pa je veljalo ravno obratno. V knjižnici II (Monteils in sod., 2008) je bilo 31,4 % neklasificiranih ruminokokov (22 sekvenc) in 24,3 % neklasificiranih sekvenc iz družine *Lachnospiraceae* (17 sekvenc), v knjižnici III (Fanedl in sod., 2009) pa 35,2 % sekvenc, ki so spadale v družino neklasificiranih *Ruminococcaceae* (173 sekvenc) in 14,6% neklasificiranih sekvenc iz družine *Lachnospiraceae* (72). Kar precej je izstopala tudi družina neklasificiranih klostridijev, kamor smo iz knjižnice I uvrstili 9 sekvenc (19,6 %), iz knjižnice II 6 sekvenc (8,6 %) in iz knjižnice III 94 sekvenc (19,1 %). Knjižnica I je imela smo 2 sekvenci (4,3 %), ki sta klasificirani. To sta bili sekvenci iz rodu *Acetivibrio*. Tudi v knjižnici II smo s 11,4 % naleteli na ta rod in v knjižnici III z 2,6 %.

Največ klasificiranih predstavnikov iz debla *Firmicutes* v knjižnici III je imela družina *Ruminococcaceae*. Najštevilčnejši je bil rod *Ruminococcus* (16 sekvenc oz. 3,3 %), nekaj je bilo tudi sekvenc iz rodu *Butyricoccus* (10 sekvenc oz. 2 %) in *Oscillibacter* (5 sekvenc oz. 1 %). Rodove, kot so *Lactinofactor* (0,2 %), *Sporobacter* (0,2 %), *Papillibacter* (0,2 %), *Bacillus* (1 %), *Terribacillus* (0,2 %), *Staphylococcus* (0,2 %), *Coprococcus* (1,2 %) in *Allobaculum* (0,2 %), smo zasledili samo v knjižnici III.

Deblo *Bacteroidetes* je bilo s kar 5,9 % najbolj zastopano v knjižnici III, a v primerjavi s knjižnicama I (2,2 %) in II (4,3 %) to ni bilo prav veliko več. V knjižnici I smo našli samo 1 sekvenco, ki je spadala v to deblo, natančneje med neklasificirane *Porphyromonadaceae*. Med slednje se je uvrstila tudi ena sekvenco iz knjižnice II, ostali dve pa v rod *Butyricimonas* in družino neklasificiranih *Bacteroidales*. Za knjižnico III je bila značilna nekoliko večja pestrost. Kar 15 sekvenc (3 %) je pripadalo rodu *Bacteroides*, 4 sekvence rodu *Alistipes*, 2 sekvenci rodu *Odoribacter* in ena rodu *Butyricimonas*. 1,4 % sekvenc je ustrezalo neklasificiranim družinam *Porphyromonadaceae* in *Bacteroidales*.

Med verukomikrobije se je uvrstilo največ sekvenc iz knjižnice III. Kar 6 sekvenc (1,2 %) je bilo iz rodu *Akkermansia*. V knjižnici II je bila tega rodu le 1 (1,4 %) in v knjižnici I le 2 sekvenci (4,3 %). Iz knjižnic I in III so se po 3 sekvence uvrstile v neklasificirano družino *Verrucomicrobiaceae*.

Bakterij iz debla proteobakterij ni bilo moč zaslediti v knjižnici I. Je pa bila prisotna po 1 sekvenco iz rodu *Variovorax* tako v knjižnici II kot v knjižnici III. Na največ predstavnikov tega debla smo naleteli v slednji. Poleg že omenjenga rodu *Variovorax* smo s po eno sekvenco našli še rod *Escherichia/Shigella*, rod *Xanthobacter* in neklasificirano družino *Xanthobacteraceae*.

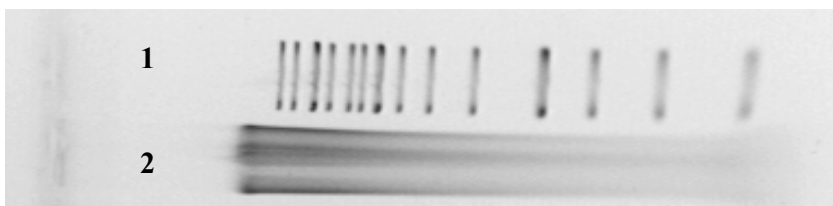
V skupino bakterij debla TM7 je spadalo 10 sekvenc (2 %) iz knjižnice III, natančneje v rod *Incertae Sedis*. Zaporedja iz ostalih knjižnic niso spadala v to deblo.

Zelo veliko sekvenc se je uvrstilo med neklasificirane bakterije. Največ, kar 13 % (6 sekvenc), je bilo sekvenc iz knjižnice I. Sledila ji je knjižnica III s 5,5 % ali 27 sekvencami

in knjižnica II z 1,4 % oziroma 1 sekvenco. Zanimivo je tudi odkritje mikroorganizmov, ki ne sodijo k bakterijam in najverjetneje spadajo med arheje (največ 46 % podobnost).

## 4.2 INSERT

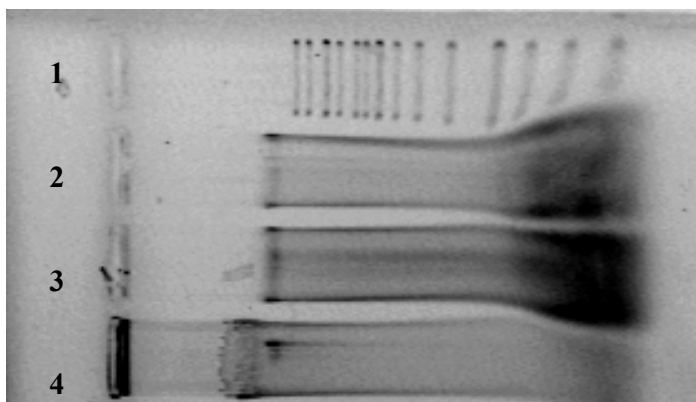
Najprej smo iz vzorca izolirali kromosomsko DNK. Na **Sliki 4** je prikazan rezultat gelske elektroforeze kromosomske DNK, ki smo ji dodali encim RNazo. Razvidno je, da je kromosomska DNA fragmentirana in dolga največ 50–70 kb.



**Slika 4:** Izolacija kromosomske DNK obdelane z encimom RNazo.

Legenda: 1 – standardna 1 kbp DNK lestvica, 2 – kromosomska DNK

Insert smo pripravili tako, da smo izvedli delno restrikcijo kromosomske DNK. Na **Sliki 5** je prikazan rezultat gelske elektroforeze ene od delnih restrikcij kromosomske DNK, ki je protrebna za pripravo insertov za metagenomske knjižnice. DNK smo cepili z restrikcijskim encimom *Bsp143I*.

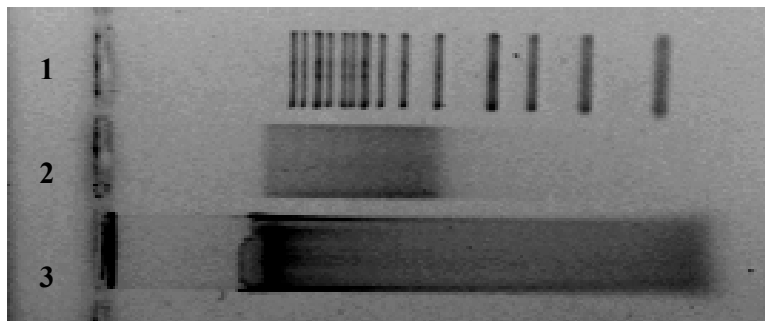


**Slika 5:** Primer agarozne (0,8 %) gelske elektroforeze delne restrikcije kromosomske DNK.

Legenda: 1 – standardna 1 kbp DNK lestvica, 2 – delna restrikcija kromosomske DNK (30 min), 3 – delna restrikcija kromosomske DNK (35 min), 4 – kromosomska DNK



Sledila je priprava insertov na ligacijo. To smo storili tako, da smo vso cepljeno kromosomsko DNK nanесли na gel in nato izrezali fragmente, večje od 5 kbp. Po cepitvi smo DNK očistili nečistoč s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (QIAGEN, 2008). Uspešnost cepljenja in čiščenja kromosomske DNK smo preverili na gelu (**Slika 6**).

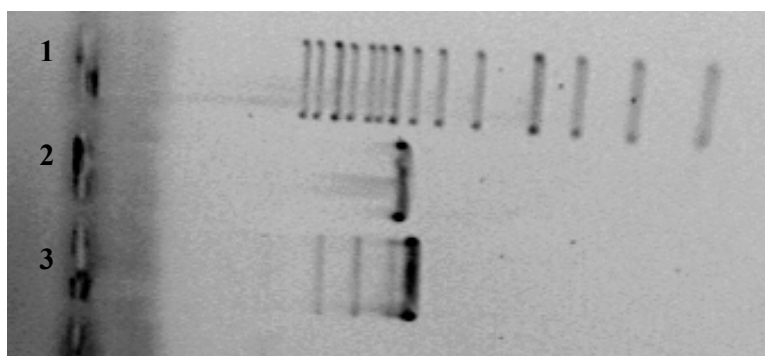


**Slika 6:** Preverjanje upešnosti cepljenja in čiščenja kromosomske DNK po delni restrikciji.

Legenda: 1 – standardna 1kbp DNK lestvica, 2 – cepljena in očiščena DNK po delni restrikciji, 3 – kromosomska DNK

### 4.3 VEKTOR

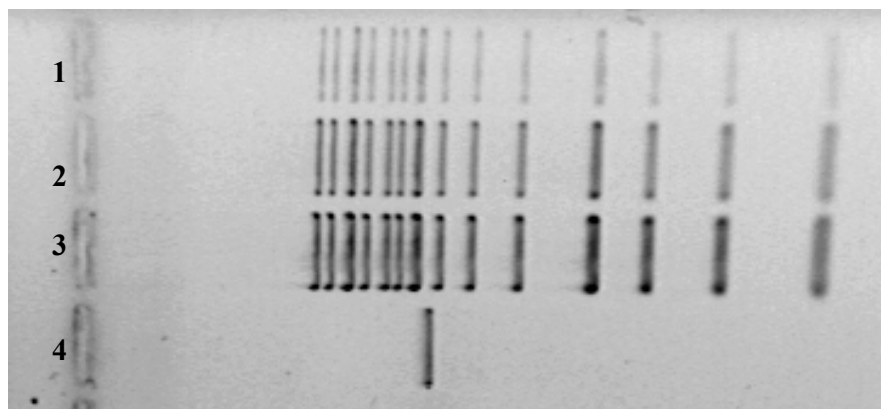
Vektor smo pripravili s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche, 2004). Nato smo plazmid cepili z restrikcijskim encimom *Bam*HI in očistili s komercialno dostopnim kompletom po navodilih proizvajalca (Roche 2008) (**Slika 7**).



**Slika 7:** Očiščen cepljen plazmid pUC19.

Legenda: 1 – standardna 1kbp DNA lestvica, 2 – očiščen cepljen plazmid, 3 – necepljen in neočiščen plazmid (opazimo več oblik plazmida: odprti krog, linearno in superzvito obliko)

Sledila je defosforilacija z alkalno fosfatazo in ponovno čiščenje plazmida (**Slika 8**).



**Slika 8:** Cepljena, očiščena ter defosforilirana plazmidna DNA.

Legenda: 1 – standardna 1kbp DNK lestvica (1 µl), 2 – standardna 1kbp DNK lestvica (3 µl), 3 – standardna 1kbp DNK lestvica (5 µl), 4 – cepljen, očiščen ter defosforiliran pUC19

#### 4.4 DOLOČANJE OPTIMALNE VELIKOSTI KNJIŽNICE ZA POPOLNO POKRITOST KNJIŽNICE IN PRIDOBITEV REKOMBINANTNEGA SEVA Z ŽELJENO LASTNOSTJO

Da z 99 % verjetnostjo ( $P$ ) zagotovimo prisotnost vsakega fragmenta iz genoma *E. coli* v metagenomski knjižnici s fragmenti ustrezne dolžine ( $v$ ) 6000 bp pri velikosti genoma ( $G$ )  $4,7 \times 10^6$  bp, bi potrebovali:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - (v / G)) \quad \dots (2)$$

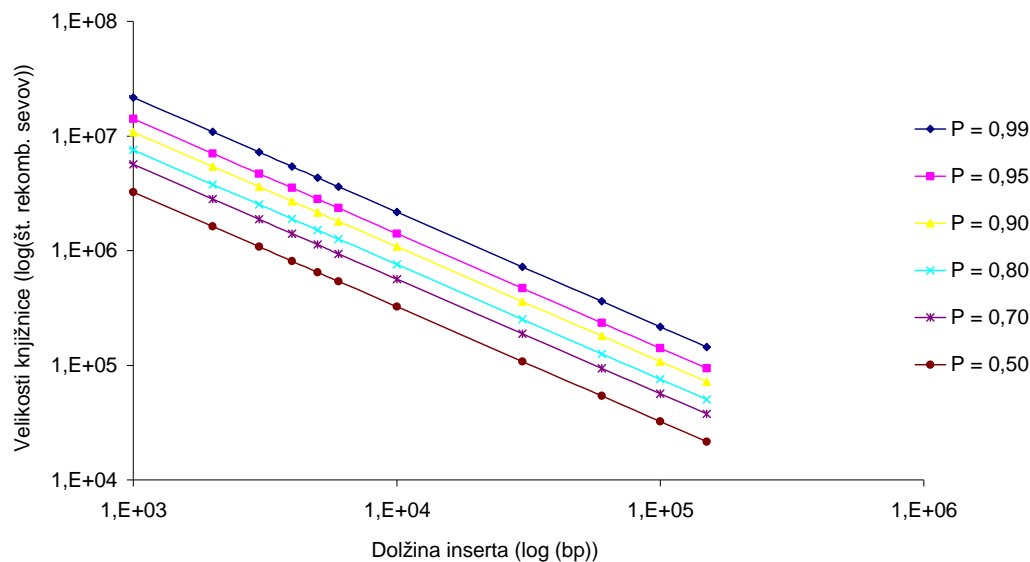
$$N = \ln(1 - 0,99) / \ln(1 - (6 \times 10^3 \text{ bp} / 4,7 \times 10^6 \text{ bp})) = 3605 \text{ rekombinantnih sevov}$$

V primeru drugačnih dolžin insertov in drugačnih verjetnosti detekcije posameznih rekombinantnih sevov v metagenomski knjižnici genoma *E. coli* se spremeni tudi velikost knjižnice (**Preglednica 3**). Za izračun števila rekombinantnih sevov za popolno pokritost knjižnice pri določeni dolžini inserta in določeni verjetnosti smo uporabili naslednje približke: za velikost genoma smo privzeli velikost genoma *E. coli* ( $4,7 \times 10^6$  bp), kot spodnjo mejo števila različnih genomov smo privzeli 500 vrst (Wang in sod., 2005), kot zgornjo pa število  $10^6$  (Ley in sod., 2008). Torej je velikost mikrobnega metagenoma v

slepem črevesu kunca vsaj  $500$  do  $10^6 \times$  velikosti genoma *E. coli*, pri čemer razlike v zastopanosti posameznih mikrobnih skupin v mikrobnih združbi še niso bile upoštevane. Za zajetje take raznovrstnosti bi ob konservativnih ocenah spodnje meje potrebovali od  $1.802.540$  do  $3609 \times 10^6$  rekombinantnih sevov.

**Preglednica 3:** Število rekombinantnih sevov, potrebnih za detekcijo poljubne sekvence genoma *E. coli* določene dolžine pri izbrani verjetnosti (P) (za ekstrapolacijo na metagenom kunčjega slepega črevesa vrednosti pomnožimo s  $500$  ali  $10^6$  rekombinantnih sevov).

Dolžina inserta (bp)	Velikost knjižnice (št. rekombinantnih sevov)					
	P = 0,99	P = 0,95	P = 0,90	P = 0,80	P = 0,70	P = 0,50
500	43.332	28.198	21.619	15.133	11.279	6486
1000	21.665	14.098	10.809	7566	5639	3243
2000	10.831	7048	5404	3783	2819	1621
3000	7220	4698	3602	2522	1879	1081
4000	5414	3523	2701	1891	1409	810
5000	4331	2818	2161	1513	1127	648
6000	3609	2348	1801	1260	939	540
10.000	2164	1408	1080	756	563	324
30.000	720	468	359	251	187	108
60.000	359	233	179	125	93	54
100.000	214	139	107	75	56	32
150.000	142	92	71	50	37	21



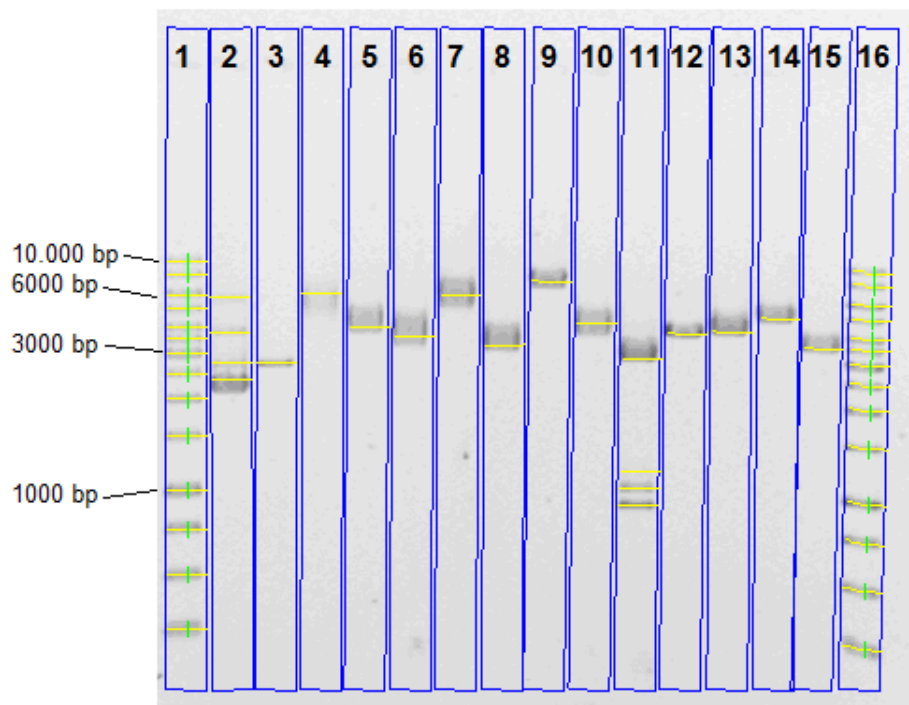
**Slika 9:** Odvisnost števila potrebnih rekombinantnih sevov v knjižnici od dolžine inserta pri različnih verjetnostih za *E. coli* (za ekstrapolacijo na metagenom kunčjega slepega črevesa je treba, za konservativno oceno števila potrebnih rekombinantnih sevov, na grafu predstavljeno število rekombinantnih sevov pomnožiti s  $500$  ali  $10^6$ ).

## 4.5 LIGACIJA, TRANSFORMACIJA IN ANALIZA DOLŽINE INSERTOV

Za vsako ligacijo smo na novo pripravili inserte (inserti A, B in C). Vektor je bil vedno enak. Ligacijsko mešanico smo transformirali v kompetentne celice z dvema metodama. Najprej smo uporabili klasični pristop z uporabo kalcijevega klorida. Ker se je izkazalo, da klasična transformacija ni dovolj uspešna, smo uporabili še metodo elektroporacije, dokler nismo bili zadovoljni z rezultati. Uspešnost ligacije smo preverjali z modro-belim testom, dolžino insertov pa določali s programom GeneTools.

### 4.5.1 Ligacija z inserti A in kemična transformacija

Pripravili smo ligacijsko mešanico z inserti A in dobljene rekombinantne plazmide na klasičen način transformirali v kompetentne celice, pripravljene s kalcijevim kloridom. Celice smo namnožili na trdnem LB gojišču ob dodatku ampicilina in X-gal. Določili smo razmerje števila belih kolonij glede na število modrih in izračunali frekvenco transformacije (**Priloga A**). Frekvenca transformacije je bila  $1,06 \times 10^6$  kolonij/ $\mu\text{g}$  plazmida. Nato smo preverili tudi dolžino insertov, in sicer tako, da smo ligacijske produkte rezali z restrikcijem encimom FastDigest *PstI* in jih nanесли na gel. Analizirali smo ga s programom GeneTools, da bi ugotovili približno dolžino insertov (**Slika 10** in **Preglednica 4**).



**Slika 10:** Analiza insertov A (iz rekombinantnih sevov pripravljenih s kemično transformacijo) z uporabo programa GeneTools.

Legenda: 1 – standardna 1kbp DNK lestvica, 2 – pUC19, 3 – cepljen, očiščen ter defosforiliran pUC19, od 4 do 15 – ligacijski produkti A, 16 – standardna 1kbp DNK lestvica

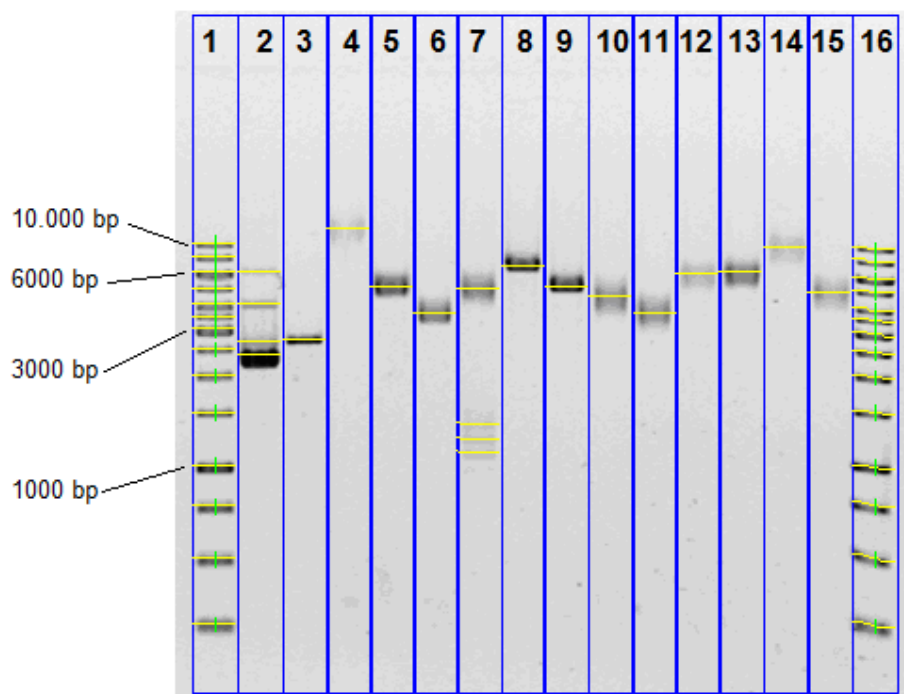
**Preglednica 4:** Določanje približne dolžine insertov A iz rekombinantnih sevov pripravljenih s kemično transformacijo.

Številka ligacijskega produkta	Dolžina ligacijskega produkta (bp)	Dolžina vektorja (bp)	Dolžina inserta (bp)
4	6175	2766	3409
5	4000	2766	1234
6	3595	2766	829
7	6000	2766	3234
8	3276	2766	510
9	8618	2766	5852
10	4878	2766	2112
11	6693	2766	3927
12	4309	2766	1543
13	4417	2766	1651
14	5132	2766	2366
15	3595	2766	829
		Povprečje:	<b>2291</b>
		SD:	<b>523</b>

Iz **Preglednice 4** je razvidno, da je povprečen insert A dolg 2291 bp.

#### 4.5.2 Ligacija z inserti B in transformacija z elektroporacijo

Pripravili smo ligacijsko mešanico z inserti B. Kompetentne celice smo z dobljenimi rekombinantnimi plazmidi transformirali z elektroporacijo. Določili razmerje števila belih kolonij glede na število modrih ter izračunali frekvenco transformacije (**Priloga B**). Frekvenca transformacije je znašala  $2,13 \times 10^8$  kolonij/ $\mu\text{g}$  plazmida. Takoj za tem smo preverili, kako dolgi so bili inserti B. Določili smo povprečno dolžino fragmentov po že omenjenem postopku (**Slika 11** in **Preglednica 5**).



**Slika 11:** Analiza insertov B (iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo) z uporabo programa GeneTools.

Legenda: 1 – standardna 1 kbp DNK lestvica, 2 – pUC19, 3 – cepljen, očiščen ter defosforiliran pUC19, od 4 do 15 – ligacijski produkti B, 16 – standardna 1 kbp DNK lestvica

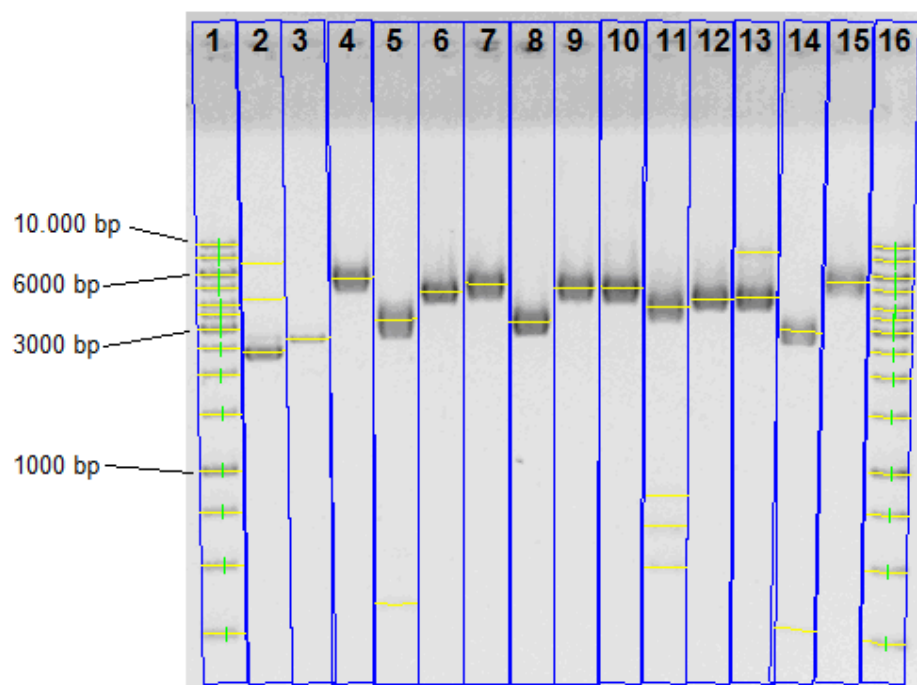
**Preglednica 5:** Določanje približne dolžine insertov B iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo.

Številka ligacijskega produkta	Dolžina ligacijskega produkta (bp)	Dolžina vektorja (bp)	Dolžina inserta (bp)
4	12500	2739	9761
5	5115	2739	2376
6	3659	2739	920
7	8689	2739	5950
8	6787	2739	4048
9	5477	2739	2738
10	4758	2739	2019
11	3895	2739	1156
12	6604	2739	3865
13	6818	2739	4079
14	10379	2739	7640
15	5000	2739	2261
		Povprečje:	<b>3901</b>
		SD:	<b>364</b>

Iz **Preglednice 5** je razvidno, da je povprečna dolžina insertov B 3901 bp.

#### 4.5.3 Ligacija z inserti C in transformacija z elektroporacijo

Ligacijsko mešanico smo pripravili z inserti C in ligacijski produkt vstavili v kompetentne celice z elektroporacijo. Nato smo določili razmerje števila belih kolonij glede na število modrih ter frekvenco transformacije (**Priloga C**). Frekvenca transformacije je bila  $4,89 \times 10^7$  kolonij/ $\mu\text{g}$  plazmida. Ker je bila ligacija uspešna, smo preverili tudi, kako dolge inserte smo pridobili (**Slika 12** in **Preglednica 6**).



**Slika 12:** Analiza insertov C (iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo) z uporabo programa GeneTools.

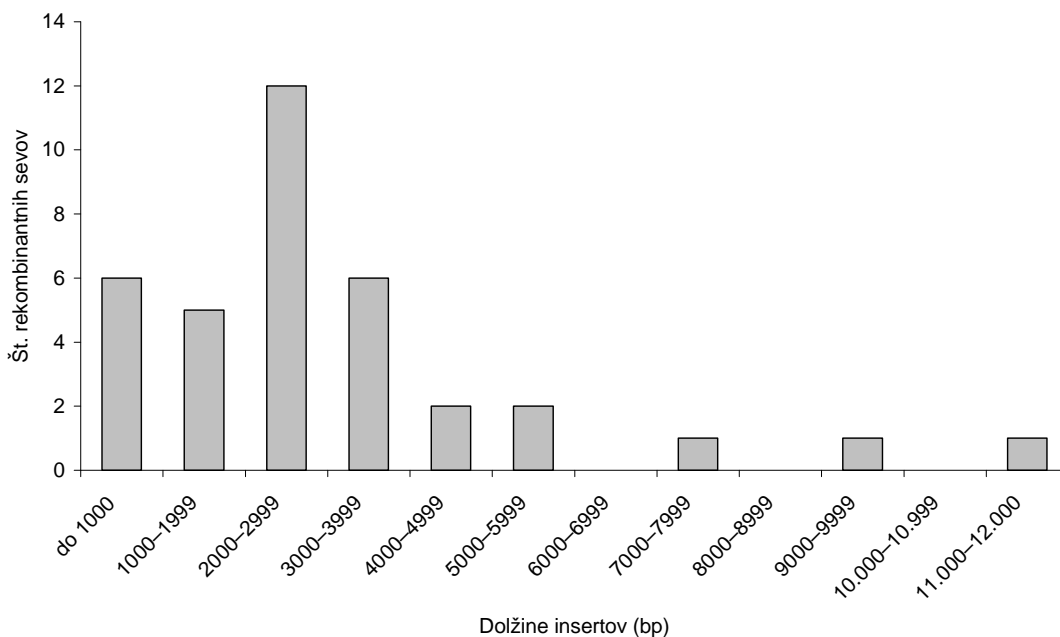
Legenda: 1 – standardna 1kbp DNK lestvica, 2 – pUC19, 3 – cepljen, očiščen ter defosforiliran pUC19, od 4 do 15 – ligacijski produkti C, 16 – standardna 1kbp DNK lestvica

**Preglednica 6:** Določanje približne dolžine insertov C iz rekombinantnih sevov pripravljenih z elektroporacijo.

Številka ligacijskega produkta	Dolžina ligacijskega produkta (bp)	Dolžina vektorja (bp)	Dolžina inserta (bp)
4	5695	2739	2956
5	6029	2739	3290
6	4758	2739	2019
7	5267	2739	2528
8	3240	2739	501
9	5267	2739	2528
10	5267	2739	2528
11	6270	2739	3531
12	4573	2739	1834
13	14059	2739	11320
14	3356	2739	617
15	5695	2739	2956
		Povprečje:	<b>3051</b>
		SD:	<b>2685</b>

Iz **Preglednice 6** lahko razberemo, da je povprečna dolžina inserta C 3051 bp.





**Slika 13:** Histogram, ki prikazuje število rekombinantnih sevov pri določeni velikosti inserta.

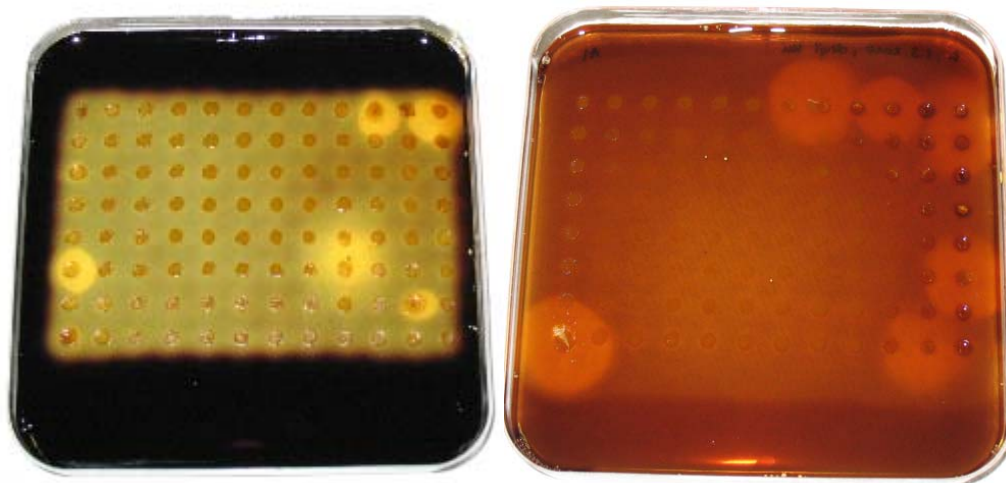
Ob določanju števila rekombinantnih sevov (**Slika 13**) pri različnih dolžinah insertov smo ugotovili, da je kar tretjina (33,33 %) vseh analiziranih sevov dolga med 2000 in 3000 bp.

#### 4.6 PRESEJALNI FIZIOLOŠKI TESTI ZA PREVERJANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Pripravili smo metagenomsko knjižnico s 5880 rekombinantnimi sevi. Povprečen insert v 18,1 Mbp veliki knjižnici je bil dolg 3081 bp.

##### 4.6.1 Presejalni testi na trdnih gojiščih

Rekombinantne seve smo po 7 dneh inkubacije na 37 °C preverili, če imajo sposobnost razgradnje danega vira ogljika. Petrijevke s ksilanom in celulozo smo prelili z lugolom, tiste z mlekom v prahu pa smo prelili z 1 M HCl. Pustili smo stati 5 do 15 min in nato okoli kolonij iskali cone zbistritve. Pri nobenem od 5880 rekombinantnih sevov nismo našli cone zbistritve. Petrijevke smo dokumentirali z digitalnim fotoaparatom. **Slika 14** predstavlja pozitivne kontrole.



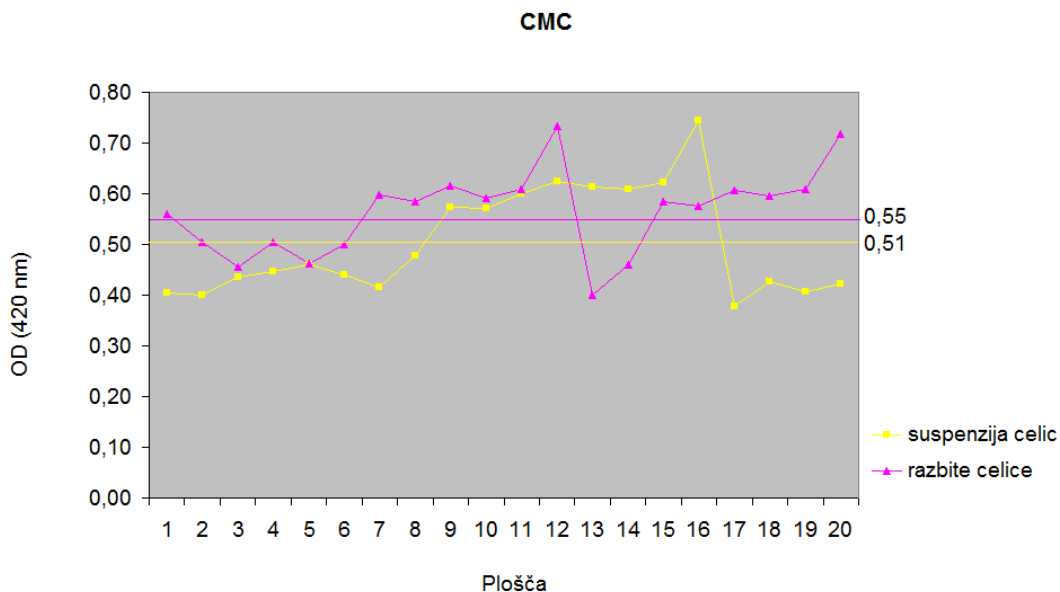
**Slika 14:** Petrijevki z gojiščem LB z ampicilinom ter IPTG, ki smo jima dodali škrob ali ksilan ter ju obarvali z lugolom. Cone zbristritve predstavljajo pozitivne kontrole z divjimi sevi. Ob testiranju rekombinantnih sevov nismo zaznali merljivih con zbristritve.

Rekombinantne seve, ki smo jih podvrgli temperaturnemu stresu, smo preverjali za intracelularno encimsko aktivnost. Po inkubaciji na detekcijskih ploščah smo kolonije pregledovali za ksilanazne in celulazne encimske aktivnosti tako, da smo jih 5 do 15 min barvali z lugolom. Iskali smo vidne cone razbarvanja okoli kolonij. Nobena kolonija ni kazala merljive ksilanazne ali celulazne aktivnosti. Plošče smo dokumentirali z digitalnim fotoaparatom.

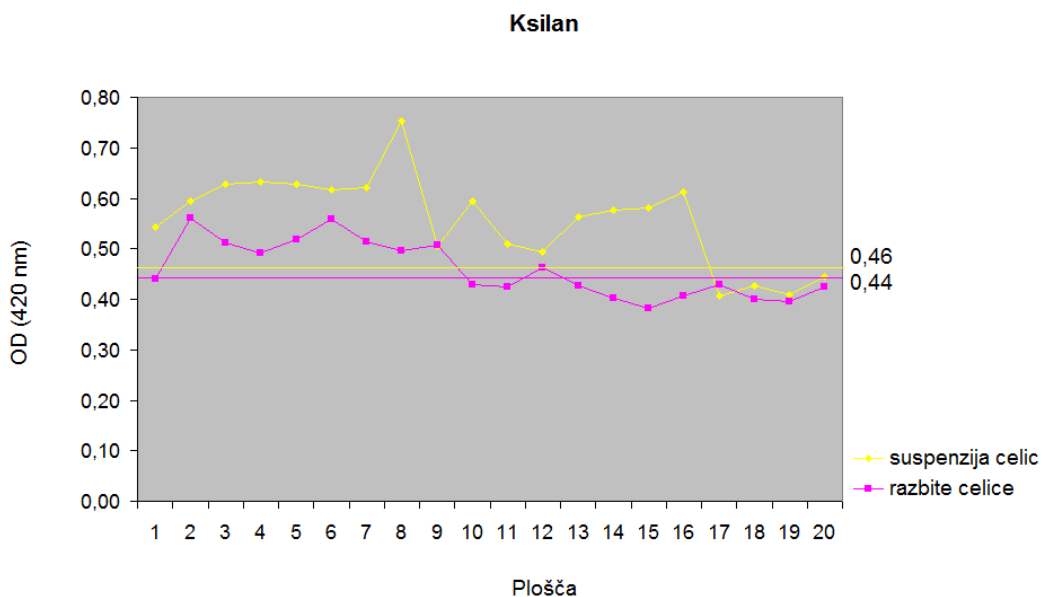
#### 4.6.2 Presejalni testi v tekočih gojiščih

Da bi znižali prag detekcije, smo uporabili gojenje v tekočih gojiščih. Zamrznjene metagenomske rekombinantne seve, urejene na posameznih mikrotitrskih ploščah, smo precepili na druge mikrotitrške plošče in sveže zrasle rekombinantne seve, združili. Eno polovico take mešanice rekombinantnih sevov smo lizirali z ultrazvokom, da so se encimi lahko sprostili, drugo polovico mešanice rekombinantnih sevov pa smo pustili celo. Dodali smo jim različne substrate (CMC, ksilan, škrob, laminarin, pektin, gelan in lichenan). Po inkubaciji smo izvedli test na redukcijske sladkorje z reagentom PAHBAH ter izmerili OD<sub>415</sub>. Kot kontrole smo uporabili meritve *E. coli* brez insertov, ki smo jih obravnavali

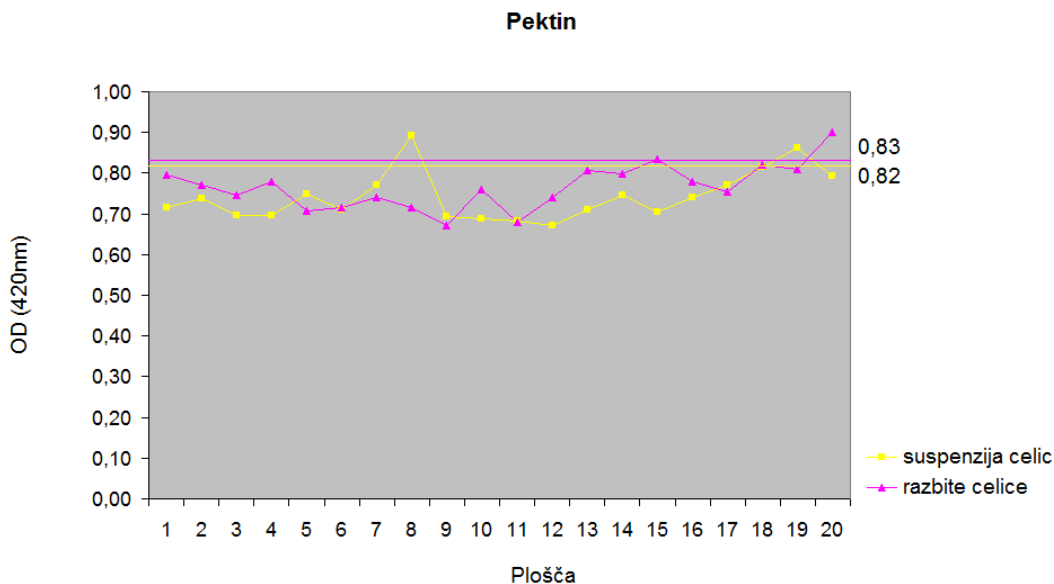
enako kot metagenomske rekombinantne seve. Našli smo nekaj mikrotitrskih plošč, katerih mešanica rekombinantnih sevov kaže povečano encimsko aktivnost (**Slika 15–Slika 21**).



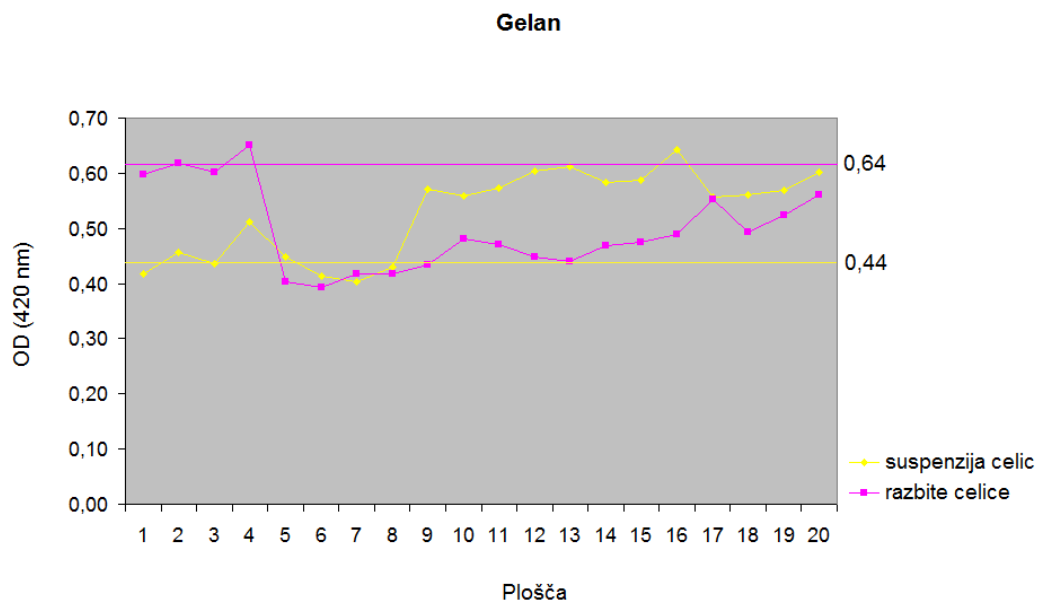
**Slika 15:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za CMC. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



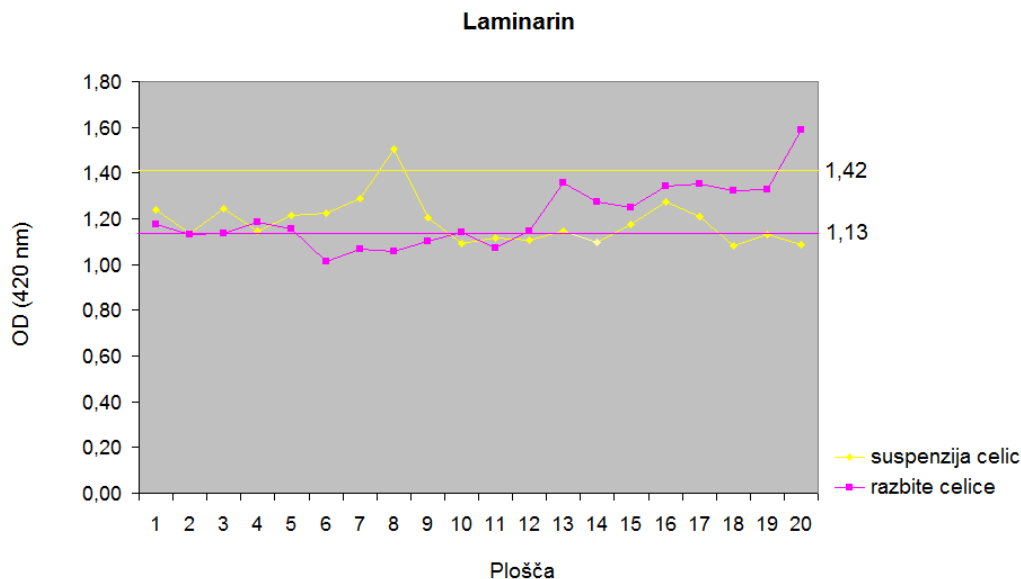
**Slika 16:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za ksilan. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



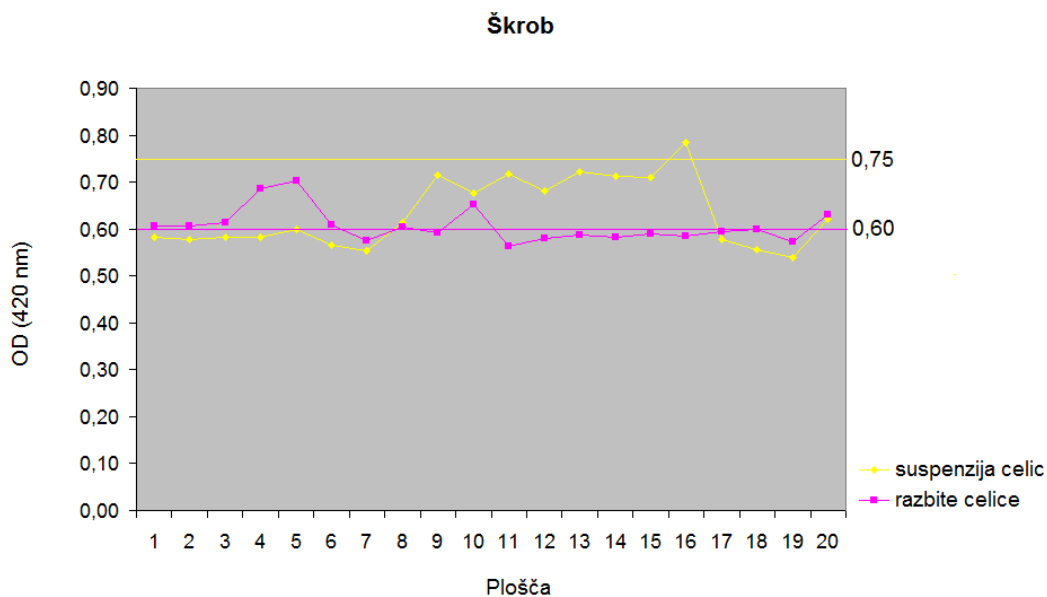
**Slika 17:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za pektin. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



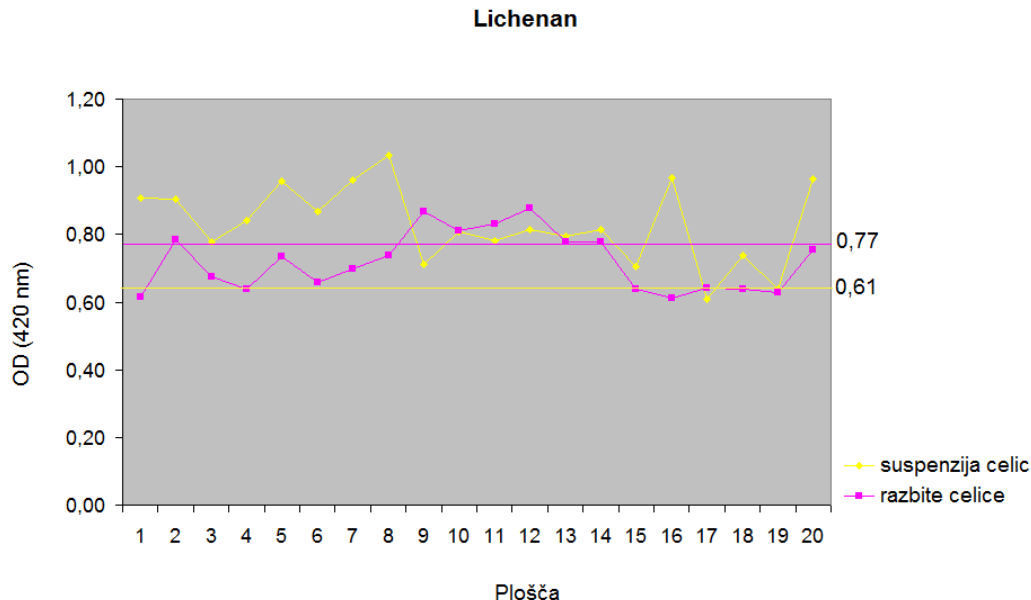
**Slika 18:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za gelan. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



**Slika 19:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za laminarin. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



**Slika 20:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za škrob. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.



**Slika 21:** Prikaz primerjave pozitivnih encimskih aktivnosti mešanic rekombinantnih sevov v suspenziji (rumeno) in mešanic liziranih rekombinantnih sevov (roza) za lichenan. Črti predstavljata povprečje kontrolnih meritev *E. coli* brez insertov s prišteto 2-kratno standardno deviacijo meritev. Vrednosti, višje od kontrolnih, predstavljajo mešanice, v katerih so prisotni rekombinantni sevi z iskano aktivnostjo.

Na **Sliki 15** lahko vidimo, da je število pozitivnih mešanic rekombinantnih sevov liziranih z ultrazvokom 13, intaktnih pa je le 8. Iz **Slike 16** je razvidno, da je več pozitivnih mešanic rekombinantnih sevov tam, kjer smo jih pustili intaktne (16) kot v primeru liziranih celic (9). Pri naslednjem polimeru pektinu lahko opazimo, da so pozitivne samo 3 mešanice, od tega 2 mešanici intaktnih sevov in 1 mešanica liziranih (**Slika 17**). V primeru gelana je prav tako samo ena mešanica rekombinantnih sevov lizirana z ultrazvokom kazala na povečano aktivnost, medtem ko je bilo pozitivnih intaktnih mšanic sevov kar 15 (**Slika 18**). Ravno obratno opazimo na **Sliki 19**, kjer je le ena mešanica intaktnih sevov in 14 mešanic liziranih sevov kazalo sposobnost razgradnje laminarina. Škrob je razgrajevala ena mešanica intaktnih rekombinantnih sevov ter 8 mešanic liziranih celic (**Slika 20**). Največ pozitivnih mešanic rekombinantnih sevov je bilo v primeru lichenana (**Slika 21**), kjer je kar 19 intaktnih in 7 liziranih mešanic kazalo povečano aktivnost.

## 5 RAZPRAVA

Z našim delom smo želeli pripraviti metagenomsko knjižnico, ki bi vsebovala rekombinantni sev z aktivnim encimom za depolimerizacijo rastlinskih polimerov. Uspešno smo pripravili metagenomsko knjižnico s 5880 rekombinantnimi sevi. Dolžina povprečnega inserta je bila 3081 bp, velikost knjižnice pa  $18,1 \times 10^6$  bp. Nekatere mešanice rekombinantnih sevov so kazale iskano encimsko aktivnost.

Vir metagenomske DNK je predstavljala mikrobna populacija kunčjega slepega črevesa. V ta namen smo določili taksonomsko hierarhijo treh knjižnic in jih nato med seboj tudi primerjali. Iz vseh podatkov skupaj lahko zaključimo, da je prebavni trakt kuncev zelo raznolik. Podobnost knjižnice I s knjižnico II je le 13 %, kar kaže na veliko diverziteto (Monteils in sod., 2008). Večina sekvenc, pridobljenih v treh opisanih študijah, je bila novih, še neklasificiranih, ki so del novih taksonomskih enot, višjih od vrste. Velja pa poudariti, da so bile določene sekvence iz vseh treh knjižnic sorodne, spet druge pa močno različne. Slednje »satelitske« vrste so po mnenju Monteils in sod. (2008) bolj variabilne in njihova zastopanost v ekosistemu je različna glede na razlike med individualnimi gostitelji in okoljem. Bennegadi in sod. (2003) so dokazali, da imajo sestava in količina krme ter zdravje kunca močan učinek na obstoječo floro slepega črevesa. Če se je kunec prehranjeval s krmo z nizko vsebnostjo vlaknin, se je količina bakterij iz skupine *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* dvakrat povečala. V bolnih kuncih se je močno povečalo število *F. succinogenes* in *F. intestinalis*, kar sedemkrat pa se je zmanjšalo število *R. albus*. S to raziskavo so potrdili vlogo vlaknin v mikrobni združbi kunčjega slepega črevesa in potrdili, da je potrebna minimalna stopnja vlaknin v prehrani, da se ohrani stabilnost in učinkovitost tega ekosistema. Abecia in sod. (2005) ter Fanedl in sod. (2009) so za poskus uporabili kunce, ki so bili intenzivno hranjeni za hitrejšo rast. V primeru Monteils in sod. (2008) pa je bil prehranjevalni režim manj intenziven. Mogoče tu tiči vzrok za razliko med knjižnicami. Seveda je treba poudariti tudi število pridobljenih sekvenc v posamezni knjižnici. Skoraj 500 sekvenc je bilo na voljo za analizo v knjižnici III, medtem ko je bilo v knjižnici II 70 in v knjižnici I le 46 sekvenc. Torej je možno, da je bila knjižnica I premajhna, da bi lahko zajela reprezentativni vzorec bakterijske združbe v

preiskovanem okolju. Ugotovili smo, da v vseh treh knjižnicah prevladujejo bakterije iz debla *Firmicutes* (**Slika 3**). To je povsem v skladu s pričakovanji, saj se že nekaj časa predvideva, da je v prebavnem traktu rastlinojedcev to deblo bakterij eno od najštevilčnejših. Med bakterije iz debla *Firmicutes* uvrščamo kar nekaj celulolitičnih bakterij (*Ruminococcus albus* in *R. flavefaciens*), ki so zelo dobro raziskane ter naj bi največ pripomogle k razgradnji krme rastlinskega izvora, a so sicer redke predstavnice vampa in drugih delov prebavnega trakta rastlinojedih živali (Brulc in sod., 2009). Primerjava med knjižnicami kaže na veliko pestrost debla *Bacteroidetes* v mikrobiomu kunčjega slepega črevesa ter hkrati na dejstvo, da je to deblo treba natančneje raziskati in oceniti njegovo funkcijo v tem ekosistemu. Presenetljivo je, da v nobeni od knjižnic niso zaznali predstavnika skupine *Prevotella/Bacteroides*. Ta skupina je v prebavnih traktih prežvekovalcev in nekaterih kopitarjev pogosta (Monteils in sod., 2008). Tretje mesto po številu predstavnikov je zasedlo deblo *Verrucomicrobia*, ki je bilo opisano šele pred kratkim. Identificirane vrste so bile po večini izolirane iz vode, prsti in iztrebkov pri raznolikih razmerah (ekstremno visoke ali nizke ter zmerne temperature, močno onesnažena okolja, živijo kot simbionti) (Schlesner in sod., 2006). Očitno so prisotne tudi v prebavnem traktu in kot je razvidno iz primerjave vseh treh knjižnic, so pomembna skupina tudi v kunčjem slepem črevesu. Deblo proteobakterij je bilo prisotno samo v knjižnicah II in III. V slednji je bilo predstavnikov več, in sicer iz rodov *Escherichia/Shigella*, *Xanthobacter* ter *Variovorax*. *Variovorax* sp. je tudi edina vrsta, ki je bila določena z več kot 97 % podobnostjo v obeh knjižnicah. Ta bakterija je bila v preteklosti najpogosteje izolirana iz tal in zaključimo lahko, da je razlog za to, da se je nahajala v analiziranih knjižnicah, ta, da jo kunci zaužijejo s hrano ali pa je predstavnica normalne mikrobne združbe slepega črevesa. Kandidatna skupina TM7 je bila prisotna samo v knjižnici III. V knjižnici I je bilo veliko sekvenc, ki jih še ne znamo klasificirati v nobeno znano bakterijsko deblo, nekaj manj pa jih je bilo tudi v knjižnici II in III. Presenetljivo je bilo dejstvo, da v nobeni od analiziranih knjižnic nismo zasledili bakterij iz rodu *Fibrobacter*. *F. succinogenes* je namreč ena od treh dominantnih celulolitičnih bakterijskih vrst v vampu ter slepem črevesu prašičev, podgan in kopitarjev. Zanimivo je tudi, da je knjižnica III zajela nekaj 16S rRNK sekvenc, ki niso bakterijske. Še najbolj podobne so arhejam. Te so sicer prisotne in pomembne predstavnice mikroflore prebavil nekaterih rastlinojedih živali (npr. v vampu). Z opisano analizo smo dokazali, da so v



slepem črevesu kunca prisotne bakterije, ki razgrajujejo lignocelulozo, sestavino rastlinskih celičnih sten. Torej je obstajala teoretična možnost, da bi z našo diplomsko nalogo pridobili rekombinantni sev, ki bi imel ksilanazno, celulazno ali katero drugo aktivnost.

Analizi knjižnic je sledila priprava metagenomske knjižnice. Najprej smo izolirali kromosomsko DNK z neposredno metodo CTAB. Ta metoda nam omogoča ekstrakcijo DNK iz večine celic ter razmeroma slabo fragmentirano DNK, ki je primerna za pripravo dolgih insertov. Večina raziskav sicer kaže v prid posredni metodi za izolacijo DNK, a smo se mi vseeno odločili za neposreden pristop brez predhodnega ločevanja mikrobnih celic od vzorca zato, ker se celulolitični mikroorganizmi pogosto močno vežejo na površino vlaken (Michalet-Doreau in sod., 2001). S posrednim pristopom bi torej večino mikrobne DNK izgubili. Iz **Slike 4** je razvidno, da je bila kromosomska DNA fragmentirana in dolga največ 50–70 kb, kar je bilo dovolj za omejitev dolžine insertov, ki nam jo postavlja plazmidni vektor. Metagenomsko DNK smo cepili z restrikcijskim encimom *Bsp143I* in se uspešno znebili manjših fragmentov DNK, ki bi posledično zmanjševali dolžino povprečnega inserta. Le-ta pa mora biti večja od dolžine povprečnega gena. Ocenjuje se, da je povprečen gen za funkcionalen genski produkt dolg okoli 1000 bp. Mi smo preverili dolžino ksilanaz iz organizmov preučevanega ekosistema, dostopnih na NCBI, in ugotovili, da se dolžina gena za encim v povprečju giblje med 1500 in 3000 bp. Restrikcijski encim *Bsp143I* ustvari konce, kompatibilne s tistimi, ki so cepljeni z restrikcijskim encimom *BamHI*, s katerimi smo rezali vektor.

Za vektor smo izbrali plazmid pUC19. Restrikcijo smo izvedli z restrikcijskim encimom *BamHI* in ga očistili (**Slika 7**). Čiščenje je bilo potrebno zato, da smo se izognili kasnejšim težavam pri ligaciji. V raztopini so namreč skupaj z vektorjem ostali tudi restrikcijski encimi, ki so sicer bili inaktivirani, a za ligacijo je treba dodati  $Mg^{2+}$  ione, ki so kofaktorji restrikcijskih encimov. Tako bi se restrikcijski encimi lahko zopet aktivirali in nam uničili ligacijske produkte. Da bi preprečili recirkularizacijo z restrikcijskim encimom obdelanega plazmida in povečali verjetnost vključevanja inserta v vektor, smo plazmid defosforilirali z alkalno fosfatazo in ga zopet očistili (**Slika 8**).

Ker smo se zavedali, da je število pozitivnih rekombinantnih sevov v metagenomski knjižnici v primerjavi z njeno velikostjo ponavadi zelo majhno, smo pred nadaljnjim delom izračunali optimalno velikost knjižnice, ki bi jo potrebovali, da bi pridobili vsaj 1 pozitiven rekombinantni sev. Uporabili smo **Enačbo 1**. V **Preglednici 3** lahko vidimo, da so številke ogromne že za genom *E. coli*. Velikost mikrobnega metagenoma v slepem črevesu kunca pa je še do milijonkrat večji (**Enačba 2**). Iz **Slike 9** je razvidno, da se velikost knjižnice z dolžino inserta spreminja. Krajši ko je insert, večja je optimalna velikost knjižnice in obratno. Dejstvo pa je, da večja knjižnica in pregledovanje več rekombinantnih sevov ne pomeni večje uspešnosti pri pridobivanju pozitivnega rezultata (**Preglednica 1**).

Sledila je priprava kompetentnih celic. Najprej smo se odločili za klasično transformacijo, zato smo pripravili kompetentne celice s kalcijevim kloridom. Za gostitelja smo izbrali celice *E. coli*. Kljub temu da ni nujno najboljši gostitelj, smo se odločili za *E. coli*, saj je prilagojena delu s plazmidnim vektorjem pUC19. Delo z *E. coli* je tudi najbolj enostavno. Pripravili smo ligacijsko mešanico z inserti A in po ligaciji smo kompetentne gostiteljske celice transformirali z ligacijskim produktom. Transformante smo nacepili na trdna gojišča LB z ampicilinom in X-gal. Inkubacija je potekla čez noč in naslednji dan smo gojišča pregledali. Ugotovili smo, da je razmerje števila belih kolonij glede na število modrih dokaj nizko (**Priloga A**). Analiza insertov (**Slika 10**) je pokazala, da je pri vseh 12 naključno izbranih kolonijah klasične transformacije prisoten plazmid z insertom. Povprečen insert A je bil dolg 2291 bp (**Preglednica 4**). Ker smo želeli pridobiti rekombinantne seve z daljšimi inserti, smo se odločili, da bomo kompetentne celice transformirali še z elektroporacijo. Postopek priprave insertov in ligacijo smo ponovili. Uporabili smo inserte B. Tokrat smo morali kompetentne celice in ligacijsko mešanico očistiti soli. Prevelika koncentracija soli bi med elektroporacijo prevajala tok in tako bi izgubili dragoceno ligacijsko mešanico, kompetentne celice ter veliko časa in truda, vloženega v pripravo le-teh. Elektroporacija načeloma daje boljšo frekvenco oziroma učinkovitost transformacije, saj naj bi električni tok povzročil, da se v celični membrani odprejo pore, skozi katere rekombinantna DNK lahko vstopi. Pred elektroporacijo smo imeli celice konstantno na ledu, da bi minimizirali škodo. Transformante smo prenesli na gojišča. Razmerje modro-belih kolonij ligacije z inserti B je bilo slabše kot v primeru ligacije z inserti A (**Priloga B**). Nekatera razmerja so bila kar 10-krat manjša. Dolžina

insertov je bila veliko boljša (**Preglednica 5**), povprečen insert B je bil dolg 3901 bp, kar je precej več kot v primeru dolžine povprečnega inserta A. Elektroporacijo smo ponovili še enkrat. Z ligacijo z inserti C smo bili najbolj zadovoljni. Razmerja modro-belih kolonij so bila boljša (**Priloga C**). Insert C je bil v povprečju dolg 3051 bp (**Preglednica 6**). Analizirali smo tudi število rekombinantnih sevov pri določenih dolžinah inserta in ugotovili, da je največ rekombinantnih sevov (12 rekombinantnih sevov oz. 33,33 %) dolžine od 2000 bp do 2999 bp (**Slika 13**). Tudi skupna povprečna dolžina insertov s 3081 bp kaže na to, da so fragmenti DNK dovolj dolgi, da bi lahko kodirali funkcionalen encim.

Sledilo je iskanje pozitivnega rekombinantnega seva. Bele kolonije vseh treh transformacij smo najprej prepikirali ter odtisnili na trdna gojišča s substrati za encime, ki smo jih iskali (celulaze, ksilanaze, proteaze). Presejalne teste za odkrivanje ekstracelularnih encimov smo izvedli z barvanjem z lugolom oziroma v primeru proteaz s HCl. Po barvanju smo vse plošče z rekombinantnimi sevi, ki so vsebovali inserte A, B in C pregledali ter ugotovili, da nismo pridobili nobenega pozitivnega rekombinantnega seva, saj okoli nobene kolonije ni bilo opaziti cone razbarvanja.

Nato smo nekaj rekombinantnih sevov preverili še za intracelularne encime. Tako smo s hitrim zamrzovanjem in odmrzovanjem pri visoki temperaturi povzročili razpad celic in posledično je v gojišče prišla tudi citoplazma liziranih celic. Tam naj bi se nahajali tudi intracelularni encimi, če bi bili sintetizirani. Suspenzijo tekočega gojišča in citoplazme smo prenesli na trdno gojišče s primernimi substrati ter inkubirali. Ponovno smo iskali cone zbistritve po barvanju. Ni bilo pozitivnega rezultata.

Ker na trdnih gojiščih nismo uspeli določiti seva z iskano encimatsko aktivnostjo, smo se odločili, da bomo rekombinantne seve testirali še v tekočem gojišču in z več substrati. Polovico rekombinantnih sevov smo z ultrazvokom razbili tako, da se je sprostila vsebina citoplazme in s tem tudi intracelularni encimi, drugo polovico pa smo pustili intaktno in iskali ekstracelularne encime. Celicam smo dodali tudi Na-azid, ki je inhibitor celične rasti in metabolizma. Tako smo zagotovili, da razgradnjo polimerov ne povzročajo celični mehanizmi, temveč rekombinantni encimi. Dodali smo reagent PAHBAH, ki se ob

prisotnosti reduktivnih sladkorjev obarva rumeno. Merili smo absorbanco pri 420 nm in našli pozitivne rezultate. V nekaterih jamicah v mikrotitrski plošči je bil torej prisoten encim, ki je razgrajeval substrat v reduktiven sladkor. Za boljšo preglednost smo izrisali grafe, ki prikazujejo optično gostoto celic v suspenziji in liziranih celic pri 420 nm (**Slika 15–Slika 21**).

Iz grafov lahko razberemo, da se prisotnost aktivnih biokatalizatorjev razlikuje med intaktnimi in liziranimi celicami. Hkrati velja, da so razlike v aktivnosti tudi med različnimi rastlinskimi polimeri. Na splošno lahko zaključimo, da je bilo več pozitivnih mešanic rekombinantnih sevov prisotnih tam, kjer smo celice pustili intaktne. Ta rezultat je zelo zanimiv, saj smo pričakovali večjo aktivnost pri liziranih celicah. Logično je namreč, da bi pri slednjih zaznali tako ekstracelularne encime kot tiste, ki se načeloma ne sproščajo iz celic, torej bi bilo več pozitivnih mešanic v tem primeru. Iz tega sledi, da ultrazvočna obdelava celic morda poškoduje/denaturira tudi encime oziroma jih inaktivira. Iz podatkov, ki jih imamo, lahko torej predvidevamo le, da so bili zaznani encimi večinoma ekstracelularni. Razlog za to, da aktivnosti na trdnih gojiščih nismo zaznali morda tiči v tem, da gostitelj, kot je *E. coli*, verjetno nima ustreznih sistemov izločanja. Torej so bili encimi lahko praviloma ekstracelularni, a jih gostitelj ni bil zmožen izločiti iz celice. Možno je, da smo pozitivne rezultate pridobili v primeru liziranih celic ravno iz prej omenjenega razloga. Obstaja pa tudi verjetnost, da so nekateri encimi postali funkcionalni šele po lizi celic. Tako je bil lahko v nekem rekombinantnem sevu zapis za eno polovico encima, v drugem rekombinantnem sevu pa zapis za drugo, in ko so se citoplazme vseh rekombinantnih sevov v jamici združile, se je združil tudi encim in tako postal funkcionalen. Menimo, da je vzrok za to, da aktivnosti na trdnih gojiščih nismo zaznali, v tem, da je bila premajhna in je zato s prostim očesom nismo opazili, saj je bila koncentracija encimov zelo nizka. V primeru merjenja intenzitete rumene barve reagenta PAHBAH ob prisotnosti reduktivnih sladkorjev pa spektrofotometer zazna že zelo majhne spremembe v absorbanci. Same izmerjene aktivnosti rekombinantnih sevov so sicer majhne, a jih lahko pripišemo temu, da so bile mešanice rekombinantnih sevov 100-krat razredčene.

Dejstvo je, da so bile vrednosti optične gostote pri intaktnih rekombinantnih sevih večje od tistih pri liziranih rekombinantnih sevih, torej lahko zaključimo, da je bila v naši metagenomski knjižnici prisotna tako intracelularna kot ekstracelularna aktivnost, le da je bila slednja precej višja (**Slika 15–Slika 21**). To je v skladu z dejstvom, da je lignoceluloza netopna in njena razgradnja večinoma poteka zunaj celice (Leschine, 1995). Razlike so bile opazne tudi na nivoju polisaharidov. Največjo aktivnost so rekombinantni sevi pokazali v primeru lichenana, najmanjšo pa v primeru pektina. Ta podatek je zanimiv, saj je pektin v krmi rastlinskega izvora količinsko precej bolj zastopan kot lichenan. Odstotek rekombinantnih sevov, ki so imeli sposobnost razgradnje celuloze (52,5 %) in ksilana (62,5 %), je bil veliko bolj pričakovan. Pri gelanu je bila večja ekstracelularna aktivnost. Amilazna aktivnost je bila majhna. Da bi aktivnost encimov zaznali že na trdnih gojiščih, bi morali verjetno rekombinantne seve testirati za več polisaharidov. Ob majhni aktivnosti pa bi morali imeti bolj učinkovit sistem detekcije (visoko zmogljivostne avtomatizirane presejalne teste) ali pa bi se iskanja posameznih pozitivnih rekombinantnih sevov lotili s sekvenciranjem.

V tej nalogi pripravljena genetska orodja za iskanje novih encimov pa odpirajo popolnoma novo možnost v prihodnosti. V naslednjem koraku nameravamo sinhronizirati in maksimizirati sintezo mRNK tarčnih genov v vzorcu z dodajanjem ciljnega substrata. Po izolaciji celokupne RNK bomo izvedli poliadenilacijo 3' konca ter poliadenilirano RNK z reverzno transkriptazo prevedli v cDNK, jo klonirali v gostitelja ter tako pridobili knjižnico cDNK, ki bo vsebovala bistveno večjo gostoto sekvenc iskanih genov, ki jih lahko zaznamo z razvitimi fiziološkimi testi. Orodje je pripravljeno tako, da lahko kloniramo produkte reverzних transkripcij in izmerimo aktivnost nastalih proteinov iz vnešenih sekvenc. Orodje je torej primerno tudi za pripravo in analizo knjižnic cDNK.

## 6 SKLEPI

- Taksonomska hierarhija 16S rRNK knjižnic mikrobnih združb kunčjega slepega črevesa, ki so dostopne v podatkovnih zbirkah na spletu, kaže na prisotnost mikroorganizmov, ki imajo sposobnost razgradnje kompleksnih rastlinskih polimerov ter na veliko raznolikost le-teh,
- iz vsebine kunčjega slepega črevesa smo ekstrahirali celokupno DNK primerne kvalitete za pripravo insertov metagenomske knjižnice,
- povprečna dolžina insertov v rekombinantnih sevih, ki znaša 3081 bp, je večja od dolžine povprečnega tarčnega gena,
- razviti presejalni testi omogočajo zaznavo pozitivnih aktivnosti izraženih genov,
- metagnomska knjižnica vsebuje mešanice rekombinantnih sevov, ki so sposobni depolimerizacije vsaj enega od rastlinskih polimerov,
- pripravljena metagenomska knjižnica, velika  $18,1 \times 10^6$  bp, zadošča za odkritje pozitivnega rekombinantnega seva.

## 7 POVZETEK

Encimi so primerni katalizatorji za razvoj okolju prijaznih industrijskih procesov. Velika večina industrijsko pomembnih encimov je mikrobnege izvora, torej je pridobivanje mikrobnih biokatalizatorjev ključni korak pri razvoju novih industrijskih procesov. Težava je v dejstvu, da smo s klasičnimi laboratorijskimi tehnikami omejeni na le 1 % prokariotov, ki jih najdemo v naravi. Področje metagenomike se je razvilo kot alternativni pristop k iskanju novih sekundarnih metabolitov in encimov. Z direktnim kloniranjem metagenomske DNK v gostiteljsko celico lahko natančno in neodvisno od sposobnosti kultivacije preučimo metagenom nekega mikroorganizma.

V okviru diplomskega dela smo želeli pripraviti metagenomsko knjižnico, ki bi vsebovala rekombinantni sev z encimom, ki depolimerizira enega od rastlinskih polimerov. Metagenomsko DNK, izolirano iz vsebine kunčjega slepega črevesa, smo uporabili za pripravo plazmidne metagenomske knjižnice. Za vzorec smo izbrali vsebino kunčjega slepega črevesa, ker vsebuje mikroorganizme, ki so sposobni razgrajevati lignocelulozo. Določili smo taksonomsko hierarhijo treh 16S rRNK knjižnic mikrobnih združb kunčjega slepega črevesa, ter ugotovili, da v vzorcu lahko pričakujemo mikroorganizme z encimi, ki razgrajujejo kompleksne rastlinske polimere. Knjižnice smo med seboj tudi primerjali in zaključili, da je prebavni trakt kuncev zelo raznolik. Vsebuje veliko število bakterij, ki jih ne znamo uvrstiti v poznane vrste ali celo višje taksonomske enote. V vzorcu tako torej pričakujemo tudi neke nove še neodkrte encime. Iz vzorca smo izolirali dovolj dolgo in kvalitetno kromosomsko DNK ter pripravili inserte primerne dolžine. Le-ti so bili večji od povprečne dolžine tarčnega gena (npr. gen za ksilanazo). Pridobili smo metagenomsko knjižnico, veliko  $18,1 \times 10^6$  bp. Vsebovala je 5880 rekombinantnih sevov z 3081 bp dolgim povprečnim insertom. Knjižnico smo s presejalnimi testi na osnovi funkcije pregledali za pozitivne rekombinantne seve z iskano encimsko aktivnostjo. Z gojenjem na trdnih gojiščih s primernimi substrati nismo našli nobenega pozitivnega rekombinantnega seva. V tekočih gojiščih s posameznimi substrati smo inkubirali združene mešanice rekombinantnih sevov, ki so bili ali celi ali pa lizirani z ultrazvokom. Inhibirali smo celično rast z Na-azidom ter dodali reagent PAHBAH, ki ob prisotnosti reduktivnih

sladkorjev spremeni barvo. Rezultatom smo sledili spektrofotometrično in zasledili rekombinantne seve, ki so razgrajevali dodane substrate (celuloza, ksilan, škrob, pektin, lichenan, laminarin in gelan). Na podlagi dobljenih rezultatov smo sklepali, da aktivnosti na trdnih gojiščih nismo zaznali zato, ker je bila koncentracija encimov zelo majhna. Da bi aktivnost encimov zaznali že na trdnih gojiščih, bi morali imeti bolj učinkovit detekcijski sistem (visoko zmogljivostne avtomatizirane presejalne teste). Še bolj učinkovito bi se pridobivanja pozitivnih rekombinantnih sevov lahko lotili s pripravo cDNK knjižnic, kjer bi pričakovali večje število pozitivnih rekombinantnih sevov kot pri klasičnem pristopu oblikovanja metagenomskih knjižnic.



## 8 VIRI

- Abecia L., Fondevila M., Balcells J., Edwards J. E., Newbold C. J., McEwan N. R. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 1: 111–115
- Aehle W. 2004. *Enzymes in industry: Production and applications*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 484 str.
- Alcalde M., Ferrer M., Plou F. J., Ballesteros A. 2006. Environmental biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology*, 24, 6: 281–287
- Bennegadi N., Fonty G., Millet L., Gidenne T., Licois D. 2003. Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15, 1: 23–32
- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36, suppl. 1: D25–D30
- Bruhl J. M., Antonopoulos D. A., Berg Miller M. E., Wilson M. K., Yannarell A. C., Dinsdale E. A., Edwards R. E., Frank E. D., Emerson J. B., Wacklin P., Coutinho P. M., Henrissat B., Nelson K. E., White B. A. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6: 1948–1953
- Carabaño R., Piquer J. 1998. *The digestive system of the rabbit. V: The nutrition of the rabbit*. De Blas C., Wiseman J. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 1–17

- Cosgrove D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 6, 11: 850–861
- Courtois S., Cappellano C. M., Ball M., Francou F. X., Normand P., Helynck G., Martinez A., Kolvek S. J., Hopke J., Osburne M. S., August P. R., Nalin R., Guérineau M., Jeannin P., Simonet P., Pernodet J. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 49–55
- Daniel R. 2002. Construction of environmental libraries for functional screening of enzyme activity. V: Directed molecular evolution of proteins: or how to improve enzymes for biocatalysis. Brakmann S., Johnsson K. (eds.). Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 63–78
- Feng Y., Duan C. J., Pang H., Mo X. C., Wu C. F., Yu Y., Hu Y. L., Wei J., Tang J. L., Feng J. X. 2007. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 2: 319–328
- Flint H. J., Bayer E. A., Rincon M. T., Lamed R., White B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 2: 121–131
- Gabor E. M., de Vries E. J., Janssen D. B. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 2: 153–163
- Gabor E. M., Alkema W. B. I., Janssen D. B. 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology*, 6, 9: 879–886

- Halliwell G., Bryant M. P. 1963. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. *Journal of General Microbiology*, 32, 3: 441–448
- Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5, 10: 245–249
- Kakirde K. S., Parsley L. C., Liles M. R. 2010. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 11: 1911–1923
- Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57, 5: 503–507
- Leschine S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology*, 49: 399–426
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81: 21–27
- Ley R. E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P. J., Ramey R. R., Bircher J. S., Schlegel M. L., Tucker T. A., Schrenzel M. D., Knight R., Gordon J. I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320: 1667–1651
- Li L., McCorkle S. R., Monchy S., Taghavi S., van der Lelie D. 2009. Bioprospecting metagenomes: Glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 1: 1–11
- Lorenz P., Schleper C. 2002. Metagenome: A challenging source of enzyme discovery. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19/20: 13–19

- MacLean H. L., Lave L. B., Lankey R., Josi S. 2000. A life-cycle comparison of alternative automobile fuels. *Air & Waste Management Association*, 50: 1769–1779
- Makkar H. P. S., Singh B. 1987. Comparative enzymatic profiles of rabbit caecum and bovine rumen content. *Journal of Applied Rabbit Research*, 10: 172–174
- Marounek M., Vovk S. J., Skramova V. 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*, 73: 463–469
- Martinez A., Kolvek S. J., Yip C. L. T., Hopke J., Brown K. A., MacNeil I. A., Osburne M. S. 2004. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4: 2452–2463
- Michalet-Doreau B., Fernandez I., Peyron C., Millet L., Fonty G. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41, 2: 187–194
- Mocali A., Benedetti A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 6: 497–505
- Monteils V., Cauquil L., Combes S., Godon J. J., Gidenne T. 2008. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 3: 620–629
- Morrison M., Miron J. 2006. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and pil-proteins? *FEMS Microbiology Letters*, 185, 2: 109–115

- Morrison M., Pope P. B., Denman S. E., McSweeney C. S. 2009. Plant biomass degradation by gut microbiomes: More of the same or something new? *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 3: 358–363
- NCBI. 2010. Nucleotide: Alphabet of life. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: 4 str.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (januar 2010)
- New England Biolabs. 2002. Drop dialysis: Technical bulletin. Massachusetts, New England Biolabs: 1 str.
- Padilha M. T., Licois D., Gidenne T., Carré B., Fonty G. 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction, Nutrition, Development*, 35, 4: 375–386
- Parsley L. C., Consuegra E. J., Kakirde K. S., Land A. M., Harper Jr. W. F., Liles M. R. 2010. Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 11: 3753–3757
- QIAGEN. 2008. QIAquick spin handbook. QIAquick gel extraction kit protocol using a microcentrifuge. Valencia, QIAGEN: 25–26
- RDP. 2010. Ribosomal database project. East Lansing, Ribosomal Database Project, Michigan State University: 10 str.  
<http://rdp.cme.msu.edu/> (januar 2010)
- Riesenfeld C. S., Schloss P. D., Handelsman J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 1: 525–552
- Roche. 2004. High pure plasmid isolation kit. Mannheim, Roche: 8–9

- Roche. 2008. High pure PCR product purification kit. Mannheim, Roche: 7–7
- Rondon M. R., Goodman R. M., Handelsman J. 1999. The earth's bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*, 17, 10: 403–409
- Savage D. C. 1977. Microbial ecology of gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31: 107–133
- Schlesner H., Jenkins C., Staley J. 2006. The phylum *Verrucomicrobia*: A phylogenetically heterogeneous bacterial group. V: The prokaryotes. Vol. 7: *Proteobacteria*: Delta and epsilon subclasses. 3<sup>rd</sup> ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer Science + Business Media, LLC: 881–898
- Schwienhorst A. 2002. Advanced screening strategies for biocatalyst discovery. V: Directed molecular evolution of proteins: Or how to improve enzymes for biocatalysis. Brakmann S., Johnsson K. (eds.). Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 159–174
- Singh B., Bhat T. K., Kurade N. P., Sharma O. P. 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: A microbiological and biotechnological perspective. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 2: 216–227
- Singh J., Behal A., Singla N., Joshi A., Birbian N., Singh S., Bali V., Batra N. 2009. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal*, 4, 4: 480–494
- Sleator R. D., Shortall C., Hill C. 2008. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 5: 361–366

- Steele H. L., Jaeger K. E., Daniel R., Streit W. R. 2008. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16, 1–2: 25–37
- Streit W. R., Schmitz R. A. 2004. Metagenomics: The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 5: 492–498
- Uchiyama T., Miyazaki K. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: Challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 6: 616–622
- Wahl G. M., Lewis K. A., Ruiz J. C., Rothenberg B., Zhao J., Evans G. A. 1987. Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 2160–2164
- Wang M., Ahrné S., Jeppsson B., Molin G. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 219–231
- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261–5267

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Blažu Stresu ter somentorju doc. dr. Tomažu Accettu za čas in trud, strokovne nasvete in kritike, potrpežljivost in prilagodljivost, ki sta jih namenila nastanku tega diplomskega dela.

Zahvala za pomoč gre tudi nekaterim diplomantom in zaposlenim v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo na Oddelku za zootehniko.

Posebna zahvala gre tudi podjetju Educell d. o. o., ki je prispevalo nekaj laboratorijskega materiala in s tem omogočilo nastanek tega diplomskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Darji Žgur-Bertok za strokoven, temeljit in hiter pregled diplomskega dela.

Za vso podporo, motivacijo in potrpljenje se najlepše zahvaljujem svoji družini. Hvala tudi vsem sošolcem, prijateljem in fantu, ki so mi pomagali in stali ob strani med študijem ter mi popestrili študentska leta.



## PRILOGE

**Priloga A:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti A z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

<b>Petrijevka</b>	<b>Bele kolonije</b>	<b>Modre kolonije</b>	<b>Ramerje (%)</b>
A1	16	6	267
A2	27	8	338
A3	10	1	1000
A4	27	7	386
A5	17	0	1700
A6	12	0	1200
A7	4	2	200
A8	28	3	933

**Priloga B:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti B z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

<b>Petrijevka</b>	<b>Bele kolonije</b>	<b>Modre kolonije</b>	<b>Ramerje (%)</b>
B1	345	218	158
B2	309	231	134
B3	280	277	101
B4	264	236	112
B5	300	239	126
B6	251	252	100
B7	301	224	134

**Priloga C:** Določanje uspešnosti ligacije z inserti C z izračunom razmerja med belimi in modrimi kolonijami.

<b>Petrijevka</b>	<b>Bele kolonije</b>	<b>Modre kolonije</b>	<b>Ramerje (%)</b>
C1	47	2	2350
C2	23	0	2300
C3	63	0	6300
C4	34	5	680
C5	42	0	4200
C6	60	2	3000
C7	39	0	3900
C8	69	1	6900
C9	71	0	7100
C10	31	0	3100