

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja DOBRAVC

**MOLEKULARNO TAKSONOMSKA OPREDELITEV NOVIH  
MIKOPLAZEM IZ ŽIVALSKEGA PREBAVNEGA TRAKTA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MOLECULAR AND TAXONOMYC DETERMINATION OF NOVEL  
MYCOPLASMAS FROM ANIMAL GASTROINTESTINAL TRACT**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, na Oddelku za zootehniko v Domžalah, na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije, je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin, za recenzenta pa dr. Dušan Benčina, znanstveni svetnik.

Mentor:                           prof. dr. Gorazd Avguštin

Recenzent:                       dr. Dušan Benčina, znanstveni svetnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Ines Mandič – Mulec  
  Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član:                              prof. dr. Gorazd Avguštin  
  Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član:                              dr. Dušan Benčina, znanstveni svetnik  
  Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janja Dobravc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |  |
|----|--|
| ŠD | Dn   |
| DK | UDK 579.887:577.2.08(043)=163.6  |
| KG | molikuti/ <i>Mollicutes</i> /Skupina A/prebavni trakt/domače živali/človek/geni za 16S rRNK/filogenetska analiza/verižna reakcija s polimerazo/restrikcija z restrikcijsko endonukleazo <i>PaeI</i>  |
| AV | DOBRAVC, Janja   |
| SA | AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/BENČINA Dušan (recenzent)  |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  |
| LI | 2008   |
| IN | MOLEKULARNO TAKSONOMSKA OPREDELITEV NOVIH MIKOPLAZEM IZ ŽIVALSKEGA PREBAVNEGA TRAKTA   |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)  |
| OP | XI, 62 str., 9 pregл., 9 sl., 10 pril., 80 vir.  |
| IJ | sl   |
| JI | sl/en  |
| AI | Bakterije iz redu <i>Mollicutes</i> sodijo med po Gramu pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo gvanina in citozina, katerih največja fenotipska posebnost je popolna odsotnost celične stene in posledično bolj ali manj tesna povezava s celicami evkariontskih gostiteljev. Ta vodi v prehransko zahtevnost, težavno ali nemogočo izolacijo in gojenje v <i>in vitro</i> razmerah in zato relativno slabo poznavanje okoljske razširjenosti. Nedavno so z molekularno biološkimi pristopi odkrili ribosomske sekvene poprej neznanih molikutov v prebavilih nekaterih živali in človeka in jih poimenovali molikutska Skupina A. V našem delu smo žeeli z molekularnimi tehnikami ugotoviti, ali so molikuti iz Skupine A prisotni tudi v prebavilih nekaterih drugih domačih živali. Ker smo z <i>in silico</i> analizo ugotovili, da doslej poznani, za molikute specifični začetni oligonukleotidi GPO-1e in MGSO-e1 niso primerni, smo po pregledu dostopnih ribosomskih sekvenc in filogenetski analizi, s katero smo potrdili da Skupina A tvori ločeno vejo znotraj molikutov, s programom Primrose pripravili več začetnih oligonukleotidov. Zaradi nezadovoljive specifičnosti posameznih oligonukleotidov smo preverili kombinacije delno specifičnih začetnih oligonukleotidov in izbrali par MolA 352f in 1224r kot najbolj primeren. Specifičnost za skupino A smo povečali še z uvedbo restrikcijske analize z restrikcijsko endonukleazo <i>PaeI</i> . Po določitvi optimalnih razmer pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo smo z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r pomnoževali tarčne odseke 16S rRNK v fekalnih vzorcih prašičev, krave, koze, ovce, konja, kuncev in človeka. Pričakovane pomnožke smo odkrili pri šestih od petnajstih vzorcev. Pri vseh vzorcih so nastajali tudi nespecifični PCR produkti. Razrez z restrikcijsko endonukleazo je uspel samo pri vzorcu iz debelega črevesa kunca. Natančna analiza in filogenetska razvrstitev je možna po določitvi nukleotidnega zaporedja, zato so za nedvomno potrditev prisotnosti molikutov iz skupine A potrebne nadaljnje raziskave. Menimo pa, da nudita začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r v kombinaciji z restrikcijsko endonukleazo <i>PaeI</i> primerno osnovo za pripravo učinkovitega postopka za odkrivanje prisotnosti molikutov iz Skupine A. |

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.887:577.2.08(043)=163.6  
CX *Mollicutes/Cluster A/gastrointestinal tract/animals/human/16S rRNA genes/phylogenetic analysis/polymerase chain reaction/restriction with restriction endonuclease PaeI*  
AU DOBRAVC, Janja  
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor), BENČINA, Dušan (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2008  
TI MOLECULAR AND TAXONOMYC DETERMINATION OF NOVEL MYCOPLASMAS FROM ANIMAL GASTROINTESTINAL TRACT  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XI, 62 p., 9 tab., 9 fig., 10 ann., 80 ref.  
LA sl/en  
AB Bacteria from the order *Mollicutes* belong to so-called Gram positive bacteria with low guanine and cytosine ratio. Their most apparent phenotypic characteristic is complete lack of the cell wall and subsequently more or less firm association with cells of eukaryotic hosts. This leads to nutritional fastidiousness, difficult to near impossible isolation and *in vitro* cultivation and hence, rather poor understanding of their environmental distribution. Recently, ribosomal sequences from previously unknown molicutes were retrieved from the gastrointestinal tracts of certain animals and humans using molecular biology approaches and were assigned to the molute group A. In this work, we wanted to investigate using molecular techniques, whether group A molicutes are also present in the gastrointestinal tracts of some other domestic animals. Since the *in silico* analysis showed that previously known molute-specific primers GPO-1e and MGSO-e1 were inappropriate, we have analyzed accessible ribosomal sequences of various molicutes, confirmed that group A is in fact a unique lineage within the wider group of molicutes, and have created a number of novel specific oligonucleotides utilizing the Primrose software program. Due to insufficient specificity of the prepared oligonucleotides, we have screened the specificities of combinations of prepared oligonucleotides and have chosen the pair MolA 352f and 1224r as the most appropriate. Specificity was additionally increased by the introduction of the subsequent restriction analysis using restriction endonuclease *PaeI*. After the optimization of the amplification conditions we have tried to amplify the targeted sequences from fecal samples from pigs, cow, goat, sheep, horse, rabbits and humans. The expected amplicons were detected in 6 out of 15 samples. Nonspecific products were also observed in most samples. The restriction was successful only in one sample, *i.e.* from rabbit colon. For unambiguous confirmation of the presence of the molicutes from the group A, further analysis should be performed, however. We believe, that the primer pair MolA 352f and MolA 1224r in combination with the restriction endonuclease *PaeI* offers a reasonable basis for the development of a sensitive and specific procedure, making the detection of molicutes from the group A possible.

## KAZALO VSEBINE

|  |          |
|--|----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA  | III      |
| KEY WORD DOCUMENTATION   | IV       |
| KAZALO VSEBINE   | V        |
| KAZALO SLIK  | VIII     |
| KAZALO PREGLEDNIC  | IX       |
| KAZALO PRILOG  | X        |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI   | XI       |
| <br>   |          |
| <b>1 UVOD</b>  | <b>1</b> |
| 1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA   | 1        |
| <br>   |          |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>   | <b>2</b> |
| 2.1 MOLIKUTI   | 2        |
| <b>2.1.1 Metabolizem in prehranske zahteve molikutov</b>   | 3        |
| <b>2.1.2 Ekologija in habitat</b>  | 4        |
| <b>2.1.3 Taksonomija, filogenija in evolucija molikutov</b>  | 6        |
| 2.2 METODE ZA PREUČEVANJE STRUKTURE IN PESTROSTI MIKROBNIH<br>ZDRUŽB IN ODKRIVANJE NOVIH MIKROBNIH VRST V OKOLJU | 12       |
| <b>2.2.1 Tradicionalne mikrobiološke metode</b>  | 12       |
| <b>2.2.2 Molekularne metode</b>  | 13       |
| 2.3 NOVE MIKOPLAZME IZ PREBAVIL ŽIVALI   | 15       |
| <b>2.3.1 Molikuti 'Skupine A'</b>  | 15       |

|   |    |
|---|----|
| <b>2.3.2 'Candidatus Bacilloplasma'</b>   | 16 |
| <b>2.3.3. 'Candidatus Hepatoplasma crinochetonum'</b>                                       | 16 |
| <br>  |    |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b>  | 18 |
| 3.1 MATERIALI   | 18 |
| <b>3.1.1 Vzorci</b>   | 18 |
| <b>3.1.2. Kompleti</b>  | 19 |
| <b>3.1.3 Raztopine in pufri</b>   | 19 |
| <br>  |    |
| 3.2 METODE  | 20 |
| <b>3.2.1 Izolacija skupne mikrobne DNK</b>  | 20 |
| <b>3.2.2 Priprava ustreznih začetnih oligonukleotidov</b>                                   | 20 |
| <b>3.2.3 Pomnoževanje bakterijskih genov 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</b> | 21 |
| <b>3.2.4 Restrikcija dobljenih PCR pomnožkov</b>  | 23 |
| <b>3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza</b>  | 23 |
| <br>  |    |
| <b>4 REZULTATI</b>  | 25 |
| 4.1 IZOLACIJA SKUPNE MIKROBNE DNK IN NJENA PRIMEROST ZA MOLEKULARNO BIOLOŠKE ANALIZE        | 25 |
| 4.2 PRIPRAVA USTREZNIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA ODKRIVANJE MOLIKUTOV IZ SKUPINE A       | 26 |
| <b>4.2.1 Filogenetska opredelitev molikutov Skupine A</b>                                   | 28 |
| <b>4.2.2 Izdelava začetnih oligonukleotidov</b>   | 33 |
| 4.3 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI IZBRANIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV                            | 33 |

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| 4.4            | LOČEVANJE SEKVENC MOLIKUTOV IZ 'SKUPINE A' OD OSTALIH<br>MOLIKUTOV Z RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO <i>PaeI</i> | 35 |
| 4.5            | UGOTAVLJANJE NAJBOLJ PRIMERNE TEMPERATURE NALEGANJA ZA<br>ZAČETNA OLIGONUKLEOTIDA MolA 352f IN MolA 1224r   | 38 |
| 4.6            | SPECIFIČNO POMNOŽEVANJE DELOV GENOV 16S rRNK MOLIKUTOV<br>IZ 'SKUPINE A' Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO    | 40 |
| 4.7            | RAZREZ POMNOŽKOV 16S rDNK MOLIKUTOV IZ 'SKUPINE A' Z<br>RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO <i>PaeI</i>              | 41 |
| <b>5.</b>      | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>   | 46 |
| 5.1            | RAZPRAVA  | 46 |
| 5.1.1          | Molikuti 'Skupine A'  | 46 |
| 5.1.2          | Iskanje ustrezne metode za določanje molikutov 'Skupine A'  | 47 |
| 5.1.3          | Pomnoževanje delov genov 16S rRNK 'Skupine A' z verižno reakcijo s<br>polimerazo                            | 48 |
| 5.1.4          | Restrikcija PCR pomnožkov z restrikcijsko endonukleazo <i>PaeI</i>  | 50 |
| 5.1.5          | Nadaljnje raziskave   | 50 |
| 5.2            | SKLEPI  | 52 |
| <b>6</b>       | <b>POVZETEK</b>   | 53 |
| <b>7</b>       | <b>VIRI</b>   | 56 |
| <b>ZAHVALA</b> |   |    |
| <b>PRILOGA</b> |   |    |

## KAZALO SLIK

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| <b>Slika 1</b> | Filogenetsko drevo mikoplazem, izdelano na osnovi 16S rDNK sekvenc<br>(Razin, 2006)   | 7  |
| <b>Slika 2</b> | Na 1 % agarozni gel naneseni PCR pomnožki 16S rDNK, pomnoženi s splošnima bakterijskima začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401R  | 25 |
| <b>Slika 3</b> | Filogenetsko drevo vseh uporabljenih 16S rDNK sekvenc izdelano z metodo združevanja sosedov   | 30 |
| <b>Slika 4</b> | Poddrevo 'Skupina A', prikazane 16S rDNK sekvence in njihov izvor   | 31 |
| <b>Slika 5</b> | Filogentesko drevo 16S rDNK sekvenc, ki smo jih uporabili za izračun DNK distanc  | 32 |
| <b>Slika 6</b> | Na 1 % agarozni gel nanešeni produkti PCR reakcije z gradientno temperaturo z začetnima oligonukleotidoma MolA352f in MolA1224r   | 39 |
| <b>Slika 7</b> | Na 1 % agarozni gel naneseni PCR pomnožki 16S rDNK z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r vseh vzorcev   | 40 |
| <b>Slika 8</b> | Na 1 % agarozni gel nanešeni produkti preparativne (100 µl) PCR reakcije z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r pred in po čiščenju s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit | 42 |
| <b>Slika 9</b> | Na 1 % agarozni gel naneseni (približno 9-krat skoncentrirani) PCR pomnožki 16S rDNK vzorcev iz debelega in slepega črevesa kunca, govejega vampa in človeškega blata po restrikciji z <i>PaeI</i>    | 44 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                      |   |    |
|----------------------|---|----|
| <b>Preglednica 1</b> | Taksonomija razreda <i>Mollicutes</i> ( <i>Mollicutes</i> , 2004)   | 8  |
| <b>Preglednica 2</b> | Glavne značilnosti in taksonomija razreda <i>Mollicutes</i> (Razin, 2006)   | 11 |
| <b>Preglednica 3</b> | Seznam živali, katerih vzorce blata smo uporabili za osamitev skupne DNK  | 18 |
| <b>Preglednica 4</b> | Seznam in značilnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov  | 22 |
| <b>Preglednica 5</b> | PCR protokoli   | 22 |
| <b>Preglednica 6</b> | Prikaz napak pri naleganju začetnih oligonukleotidov GPO-1e in MGSO-e1 na tarčne 16S rDNK sekvence Skupine A ter na 16S rDNK sekvence iz ' <i>Candidatus Bacilloplasma</i> '                        | 27 |
| <b>Preglednica 7</b> | Prikaz DNK distanc med izbranimi 16S rDNK sekvencami  | 32 |
| <b>Preglednica 8</b> | Rezultati <i>in silico</i> analize primernosti začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r za določanje molikutov 'Skupine A'   | 34 |
| <b>Preglednica 9</b> | Naleganje začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r na tarčne sekvence in uporabnost restriktaze <i>PaeI</i> pri razlikovanju skupine A od ostalih molikutov in neklasificiranih firmikutov | 37 |

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1** Seznam sekvenc, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: Skupina A
- Priloga A2** Seznam sekvenc, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: *Acholeplasma/AnaeroplasmaI, Candidatus Bacilloplasma, Candidatus Hepatoplasma crinochetonum, Termitska skupina*
- Priloga A3** Seznam sekvenc, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: Skupina B, Ostali
- Priloga B** Prikaz poddrevesa *Acholeplasma/Anaeroplasma*
- Priloga C** Prikaz poddrevesa '*Candidatus Bacilloplasma*'
- Priloga D** Prikaz poddrevesa '*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*'
- Priloga E** Prikaz poddrevesa Termitska skupina
- Priloga F** Prikaz poddrevesa Skupina B
- Priloga G** DNK distance med 16S rDNK sekvencami Skupine A
- Priloga H** Prikaz pozicije napačnega naleganja na 16S rDNK sekvence, ki jih najdeti oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r od dovoljenih dveh napakah

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

**16S rDNK** zapis za malo podenoto ribosoma

**bp** bazni par

**CTAB** heksadeciltrimetilamonijev bromid

**DNK** deoksiribonukleinska kislina

**dNTP** 2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat

**EBI** European Bioinformatics Institute

**G+C** gvanin in citozin

**MEGA** Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**NCBI** The National Center for Biotechnology Information

**nt** nukleotid

**PCR** Polymeraze Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo)

**RDP** Ribosomal Data base Project

## 1 UVOD

Bakterije iz redu *Mollicutes* (latin.: mehkokožci, mollis-mehka, cutis-koža) so prokariontski mikroorganizmi, ki jih najbolj opredeljuje popolna odsotnost celične stene. Zaradi nenavadnih in pogosto nepoznanih prehranskih zahtev je njihovo gojenje v *in vitro* laboratorijskih razmerah izredno težavno, kar je tudi razlog, da smo do nedavnega poznali relativno majhno število molikutskih vrst, večinoma tistih, ki so povezane s kakšno boleznjijo pri ljudeh, živalih ali rastlinah. Razvoj in vse pogostejša uporaba molekularnih metod v zadnjih letih sta omogočila izvedbo mikrobno ekoloških študij, ki so med drugim pokazale, da so molikuti v naravi zelo razširjeni. Tako so jih oz. njihove sekvence odkrili pri ljudeh in drugih sesalcih, plazilcih, ribah, členonožcih in pri številnih rastlinah. Nekatere molikute že dolgo poznamo, druge pa spoznavamo šele sedaj in pogosto o njih razen taksonomske uvrstitve ne vemo nič drugega. Tako so v hepatopankreasu kopenskega rakca *Porcellio scaber* nedavno odkrili bakterije iz razreda *Mollicutes* in jih poimenovali '*Candidatus Bacilloplasma*' (Kostanjšek in sod., 2007). V molekularno ekoloških raziskavah mikrobnih združb iz prebavil ljudi, prašičev, konjev in vampa goveda so raziskovalci odkrili tudi ribosomske sekvence do sedaj še neznane skupine molikutov, ki so jih poimenovali Skupina A (Leser in sod., 2002). Tudi v prebavnem traktu lososov so odkrili doslej še nezane pripadnike te mikrobne skupine, ki so za povrh še popolnoma prevladujoči v tem ekosistemu (Holben in sod., 2002).

### 1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA

Doslej so mikroorganizme s sekvencami 16S rDNK iz molikutske skupine A odkrili v prebavnem traktu človeka, prašiča in goveda naključno, ob preiskovanju splošne strukture mikrobnih združb v teh ekosistemih. Domnevamo, da ti mikroorganizmi ne predstavljajo številčno dominantne skupine v prebavilih domačih živali in človeka, ki jo je z običajnimi mikrobiološkimi načini tudi težko gojiti, kar so verjetno razlogi, da je skupina zaenkrat bolj kot ne nepoznana. V tem diplomskem delu smo zato nameravali pripraviti specifični postopek za ugotavljanje prisotnosti ribosomskih sekvenc molikutov iz Skupine A in preveriti, ali so prisotni tudi v prebavnih traktih drugih živali.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MOLIKUTI

Molikuti so prokariontski mikroorganizmi brez celične stene in verjetno najmanjši organizmi, še sposobni avtonomne rasti. Kjub odsotnosti celične stene se barvajo po Gramu negativno, a so filogentsko nedvomno sorodni s po Gramu pozitivnimi bakterijami z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (v nadaljevanju G+C), ki jih uvrščamo v deblo firmikutov. Zaradi odsotnosti celične stene so molikuti občutljivi na osmotski šok in detergente, a odporni na antibiotike, ki zavirajo sintezo celične stene, kot je npr. penicilin. Tudi nastanek kolonij s specifično obliko pečenega jajca je povezan z odsotnostjo celične stene (Razin, 2006). Kljub temu, da so zaradi odsotnosti celične stene molikuti v mnogih pogledih podobni protoplastom, so v primerjavi z njimi precej bolj odporni na osmotsko lizo. To je vsaj delno povezano s prisotnostjo holesterola v plazemski membrani, ki deluje kot zelo učinkovit regulator membranske fluidnosti (Razin, 1978), saj zaradi svoje specifične zgradbe povzroči, da je plazemska membrana v stanju med gelsko in tekočo fazo (Huang in sod., 1991). Potreba po eksogenemu holesterolu je kriterij za delitev mikoplazem na dve skupini. Prva ga za rast potrebuje (rodovi *Mycoplasma*, *Anaeroplasma*, *Spiroplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*), pri drugi pa holesterol za rast ni potreben (rodovi *Acholeplasma*, *Asteroplasma*, *Mesoplasma*). Nekatere skupine mikoplazem vsebujejo lipoglikane, ki pomagajo pri stabilizaciji membrane, sodelujejo pa tudi pri pritrditvi mikoplazem na povšinske celične receptorje gostiteljskih celic. Zaradi odsotnosti celične stene in periplazemskega prostora je v plazemski membrani molikutov prisotnih veliko lipoproteinov, ki predstavljajo tudi njihove poglavite antigene (Razin, 2006).

Ker molikute obdaja le plazemska membrana, so celice pogosto okrogle oblike s premerom 0,3 – 0,8 µm. Celice nekaterih molikutov so hruškastih oblik, združene v filamente različnih dolžin ali viačnih oz. helikalnih oblik, kar kaže na prisotnost citoskeletalnih elementov (Razin, 1978). Tudi v čistih kulturah lahko opazimo različne oblike celic, in sicer kokoidne elemente različnih velikosti in filamentozne oblike različnih dolžin (Razin, 2006).

Večina molikutov je negibljivih in brez bičkov, nekateri (vključno s človeškimi in živalskimi patogeni) pa so sposobni polzenja oz. drsenja po vlažnih površinah in celo steklu. Za polzenje je potrebna pritrditev na površino s posebnim, tako imenovanim pritrditvenim organelom (Trachtenberg, 1998; Razin, 1978).

Med molikuti so s svojo helikalno obliko celic, krožno gibljivostjo in kemotakso edinstvene spiroplazme. Za gibanje in obliko celice so pri njih odgovorni citoskeletalni trakovi vzdolž osi, ki so pritrjeni v notranjosti tubularne plazemske membrane (Trachtenberg, 1998).

Reprodukcia molikutov je v principu enaka kot pri ostalih prokariontih, saj se delijo z binarno delitvijo. Pri tipični bakterijski delitvi celice je delitev citoplazme sinhronizirana z replikacijo genoma, pri molikutih pa lahko delitev citoplazme zaostaja za replikacijo genoma. Pri tem nastanejo večjederni filamenti, ki pozneje razpadajo na posamezne celice. Proces razpada filamentov na posamezne celice lahko traja nekaj minut (Razin, 1978).

DNK replikacija poteka pri molikutih podobno kot pri ostalih prokariontih, a je zaradi odsotnosti celične stene sklapljanje replikacij kromosoma z delitvijo celice bolj zapleteno. Tako so pri vrstah *Mycoplasma pneumoniae* in *Mycoplasma gallisepticum* opazili fibrilarne citoskeletalne strukture, ki so verjetno vpletene v migracijo nukleoida (Seto in Miyata, 1999).

### **2.1.1 Metabolizem in prehranske zahteve molikutov**

Zaradi majhnosti genoma molikutov, predvsem mikoplazem in ureaplastem, so odsotne, oziroma okrnjene tudi nekatere metabolne poti. Metabolne aktivnosti, ki so ohranjene, so primarno povezane predvsem s proizvodnjo energije. Pri vrstah, ki uporabljajo ogljikove hidrate, je razpon substratov običajno dokaj omejen. *Acholeplasma laidlawii* sicer ima tako EMP (Embden – Mayerhof – Parsonova pot) kot tudi PP (pot pentoze fosfata) pot glikolize, sposobna pa je tudi oksidacije piruvata do acetata in CO<sub>2</sub>, a pri mnogih mikoplazmah teh poti ni, oziroma so okrnjene (Miles, 1992). Takšna specializacija in pomanjkanje inducibilnih encimov kaže na prilagoditev mikoplazem na specifičen habitat oz. gostitelja, razlike v katabolnih aktivnostih pa se odražajo tako v ekologiji kot tudi pri

patogenosti mikoplazem (Miles, 1992). Ker mnoge zaradi odsotnosti citokromov in kinonov ne izvajajo oksidativne fosforilacije (izjema je npr. *M. arthritidis*, ki poseduje celotno elektronsko transportno verigo), se ATP tvori s substratno fosforilacijo, pri fermentativnih vrstah med glikolizo, pri nefermentativnih vrstah pa preko arginin dehidrogenazne poti (Razin, 1978). Nekatere namesto ATP kot vir energije za reakcije uporabljajo pirofosfat. Poleg odsotnosti citokromov je z izjemo malat dehidrogenazne aktivnosti pogosto pomankljiv ali odsoten tudi ciklus citronske kisline (Pollak in sod., 1997). Nekaterim molikutom manjka dUTPazna aktivnost in aktivnost uracil-DNK glikozilaze, ki sta potrebni za omejevanje vgradnje, oziroma odstranjevanje uracila iz DNK, kar bi lahko bilo povezano z nenavadno hitro evolucijo molikutov (Pollack in sod., 1997). Anabolizem molikutov je v veliki meri odvisen predvsem od ekstracelularnih virov aminokislin, nukleinskih kislin in lipidov.

Striktna potreba ureaplazem po eksogeni urei ni edinstvena samo znotraj molikutov, temveč tudi med prokarionti (Razin, 1978). Ker pri ureaplazmah do sedaj še niso odkrili niti arginin dehidrolazne poti za sintezo ATP, niti glikolize, predvidevajo, da je pri teh mikroorganizmih intracelularna hidroliza uree in akumulacija amonija in amonijevega iona preko kemoosmotskega mehanizma sklopljena s sintezo ATP (Razin, 1978). Ureaza, nujna za ta proces, je po strukturi in zgradbi podobna ureazam drugih prokariontov, njena specifična aktivnost pa je po ocenah avtorjev vsaj 100-krat večja (Blanchard in sod. 1988).

### **2.1.2 Ekologija in habitat**

Uporaba molekularnih tehnik, ki so olajšale odkrivanje in identifikacijo novih vrst, je pokazala, da so molikuti v naravi zelo razširjeni. Naseljujejo ljudi, sesalce, ribe, plazilce, žuželke in rastline.

Mikoplazme običajno kažejo striktno tkivno in gostiteljsko specifičnost, ki je verjetno odraz prehranskih zahtev in parazitskega načina življenja. Primarni habitati živalskih in človeških mikoplazem so sluznice urogenitalnega in respiratornega trakta, oči, prebavni trakt, mlečne žleze in sklepi (Razin, 2006). Nekateri predstavniki rodov *Mycoplasma* in *Ureaplasma* so v urogenitalnem traktu prisotni kot del normalne mikrobiote, spet drugi

povzročajo bolezni (*M. pneumoniae* povzroča primarno atipično pljučnico, *M. genitalium* negonokokni uretitis, *M. hominis* genitalne okužbe, *Ureaplasma urealyticum* ureatritis pri moških) (Razin, 2006; Rivera-Tapia in sod., 2002). Zaradi vse večjega števila bolnikov z različnimi oblikami imunskeih pomankljivosti (AIDS, zdravljenje pacientov z imunosupresivnimi zdravili), je vedno več poročil tudi o izolaciji mikoplazem iz organov in tkiv, ki niso njihov običajni habitat (Razin, 2006). Nekatere vrste so za človeka nepatogene in živijo komenzalno npr. v orofarinksu (*M. salivarium* in *M. orale*). *U. urealyticum* je možno izolirati tudi iz spodnjega urogenitalnega trakta zdravih posameznikov (Razin, 2006).

Izmed 200 vrst molikutov, ki naseljujo živali, je le za nekatere znano da delujejo patogeno, večinoma iz rodu *Mycoplasma*. Patogene mikoplazme so pomembne iz ekonomskega vidika, saj okužbe z njimi zmanjšajo donose pri živinoreji. Komenzalne mikoplazme, ki imajo pogosto podobne antigenske značilnosti kot patogene mikoplaze, so lahko vzrok navzkrižnih reakcij pri serološki diagnostiki. Patogene mikoplazme imajo očitno afiniteto do sluznic, saj praviloma naseljujejo respiratorni sistem, mlečne žleze in urogenitalni trakt. Večina živalskih mikoplazem povzroča kronične bolezni z bolezenskimi znaki, smrtnost pa je majhna (Frey, 2002). Iz vampa goveda so izolirali tudi dve nepatogeni anaerobni vrsti molikutov, *Anaeroplasma bactoclasticum* in *Anaeroplasma abactoclasticum*. Obe vrsti potrebujeta za rast sterole, a se razlikujeta po tem, da se *A.bactoclasticum* prehranjuje z drugimi bakterijami v vampu, *A.abactoclasticum* pa ne. Razlikujeta se tudi glede na razpon substratov za fermentacijo ter po glavnih fermentacijskih produktih (Robinson in Hungate, 1973; Robinson in Allison, 1975; Robinson in sod., 1975; Robinson, 1984).

Rastline in insekti so gostitelji za predstavnike rodov *Acholeplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma* in *Phytoplasma*. Aholeplazme, entomoplazme in mezoplazme so večinoma saprofiti, ki rastejo na površini rastlin, v insektih pa so komenzali ali simbionti. Celice so pleomorfni oblik. Spiroplazme so izolirali iz številnih insektov. Pojavljajo se tudi kot saprofiti na površini rastlin, nekatere vrste so za rastline patogene. Fitoplazme so molikuti, povezani s ti. rumeno boleznijo rastlin (yellow disease). Rastline okužene s fitoplazmami kažejo motnje v normalnem ravnotežju rastlinskih hormonov ali

rastnih regulatorjev. Simptomi vključujejo pritlikavost, virescenco (zeleni cvetovi), filodijo (cvetovi se spremenijo v liste), sterilnost, razbarvanje listov (Razin, 2006).

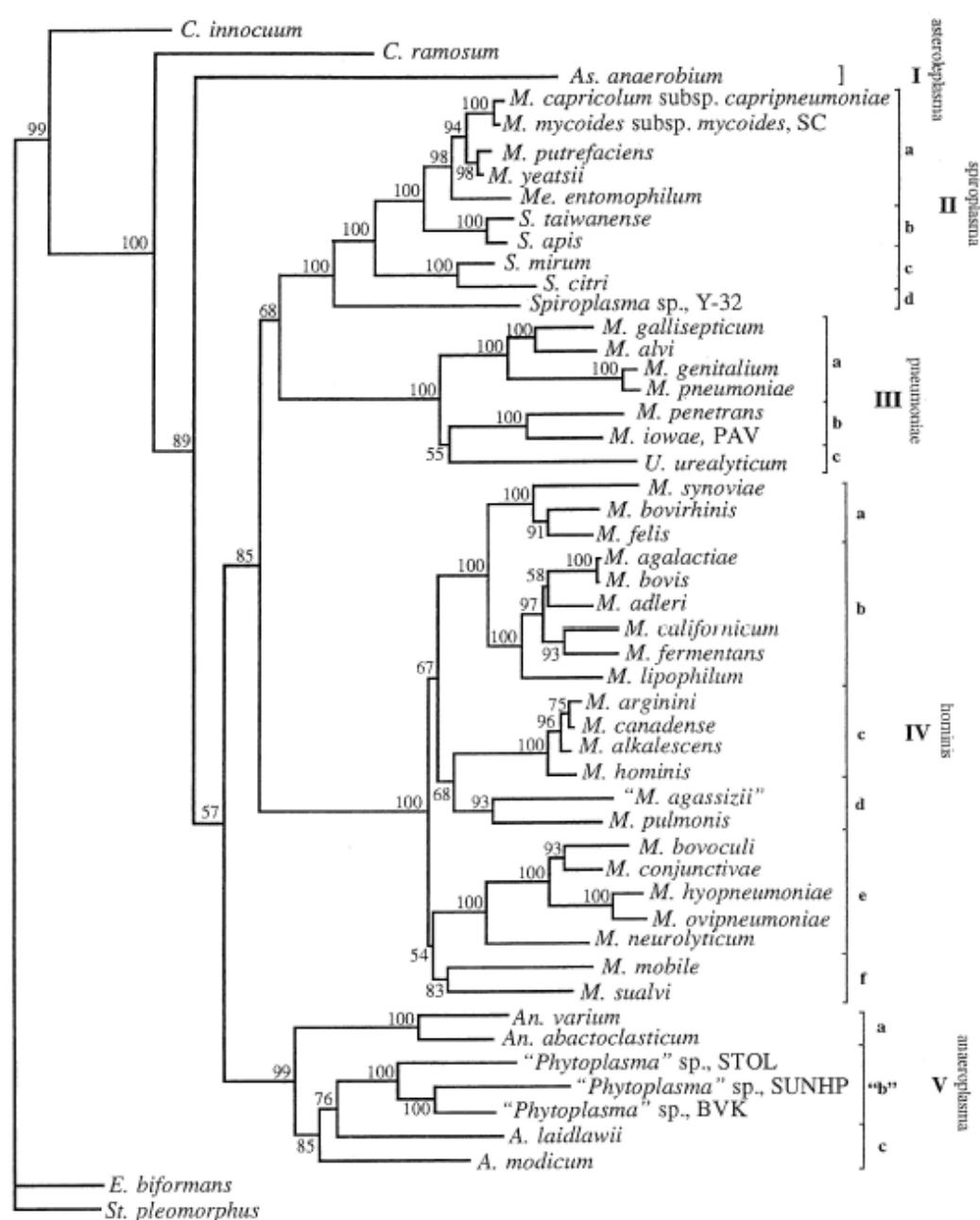
Mikoplazme pogosto okužujejo celične kulture. Slednje se uporablja pri biomedicinskih in biotehnoloških raziskavah, v industriji in pri diagnostičnih testih v bolnišnicah (Van Kuppeveld in sod., 1994). Okužbe z mikoplazmami spreminja lastnosti celic gostitelja, v tem primeru celične kulture, kar se kaže v spremembah v rasti, drugačnih encimskih vzorcih, spremenjeni zgradbi celične membrane, nastanku kromosomskih nepravilnosti, pride pa lahko tudi do indukcije citopatogenih sprememb (Stanbridge, 1971; Rottem, 2003; Van Kuppeveld in sod., 1994). Nastanek tovrstnih sprememb v celičnih kulturah lahko v veliki meri vpliva na eksperimentalne rezultate (Kong 2001; Van Kuppeveld in sod., 1994), okužene celične kulture pa so lahko tudi nevarne za ljudi, ki z njimi delajo (Kong in sod., 2001). Poročila iz različnih držav kažejo, da je bilo z mikoplazmami okuženih 10 do 80 odstotkov vseh celičnih kultur (Razin, 2006).

### **2.1.3 Taksonomija, filogenija in evolucija molikutov**

Osnovne zahteve za uvrstitev v razred *Mollicutes* (deblo VIII: *Firmicutes*) so odsotnost celične stene, velikost (oz. bolj majhnost) celic, genom z nizko vsebnostjo G+C nukleotidov in nenavadne prehranske potrebe (Weisburg in sod., 1989).

Razred *Mollicutes* (red *Mycoplasmatales*) sestavlja družine *Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* in *Erysipelochaceae* (*Mollicutes*, 2004), nadaljnja delitev na rodove je prikazana v Preglednici 1. Rodovi *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma* in *Asteroleplasma*, se med seboj razlikujejo glede na morfologijo celic, velikost genoma in prehranske potrebe. Za rod *Mycoplasma* je značilna striktna potreba po eksogenih sterolih in velikost genoma med 600 in 1350 kbp. Rod *Ureaplasma* je v velikosti genoma in potrebi po sterolih podoben mikoplazmam, za rast pa potrebuje tudi eksogeno ureo. Mikroorganizmi iz rodov *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma* in *Spiroplasma* imajo večje genome (od 900 do 2200 kbp). Aholeplazme in asteroplazme lahko rastejo brez sterolov, medtem ko jih spiroplazme in anaeroplazme potrebujejo. Anaeroplazme in

asteroplazme so striktni anaerobi, ki jih najdemo v kravjih in ovčjih vampih, ostali molikuti so fakultativni anaerobi (Weisburg in sod., 1989).



**Slika 1:** Filogenetsko drevo mikoplazem, izdelano na osnovi 16S rRNA sekvenč (Razin, 2006: 844)

**Preglednica 1:** Taksonomija razreda *Mollicutes* (*Mollicutes*, 2004: 168 – 174)Razred II. *Mollicutes*Red I. *Mycoplasmatales*

- Družina I. *Mycoplasmataceae*  
 Rod I. *Mycoplasma* (113 vrst)  
 Rod II. *Eperythrozoon* (2 vrsti)  
 Rod III. *Haemobartonella* (0 vrst)  
 Rod IV. *Ureaplasma* (7 vrst)

Red II. *Entomoplasmatales*

- Družina I. *Entomoplasmataceae*  
 Rod I. *Entomoplasma* (6 vrst)  
 Rod II. *Mesoplasma* (2 vrsti)  
 Družina II. *Spiroplasmataceae*  
 Rod I. *Spiroplasma* (34 vrst)

Red III. *Acholeplasmatales*

- Družina I. *Acholeplasmataceae*  
 Rod I. *Acholeplasma* (14 vrst)  
 Rod II. *Phytoplasma* (1 vrsta)

Red IV. *Anaeroplasmatales*

- Družina I. *Anaeroplasmataceae*  
 Rod I. *Anaeroplasma* (4 vrste)  
 Rod II. *Asteroleplasma* (1 vrsta)

## Red V. Incertae sedis

- Družina I. *Erysipelotrichaceae*  
 Rod I. *Erysipelotrix* (3 vrste)  
 Rod II. *Bulleidia* (1 vrsta)  
 Rod III. *Holdemania* (1 vrsta)  
 Rod IV. *Solobacterium* (1 vrsta)

V oklepaju je zapisano število poznanih vrst.

Primerjalne analize ribosomskih sekvenc so nedvomno potrdile sorodnost molikutov z drugimi, po Gramu pozitivnimi bakterijami z nizko vsebnostjo G+C (deblo *Firmicutes*). Znotraj debla *Firmicutes* so molikuti najbolj sorodni s skupino *Bacillus-Lactobacillus* ter z majhno podskupino, ki vključuje vrsti *Clostridium innocuum* in *Clostridium ramosum*. Primarni razcep od klostridijskih prednikov je povezan s skupino *Acholeplasma*, pri kateri je prišlo do redukcije genoma na približno 1700 kbp in izgube celične stene, nadaljnja divergenca pa naj bi vodila do anaeroplazem in spiroplazem. Iz spiroplazem sta s serijo neodvisnih in ponavlajočih se redukcij velikosti genoma do približno 700 kbp nastali veji *Mycoplasma* in *Ureaplasma* (Weisburg in sod., 1989). V grobem bi lahko degenerativno evolucijo molikutov razdelili na dve ločeni veji, ena je vodila do aholeplazem, asteroleplazem in anaeroplazem, druga pa do spiroplazem, entomopoplazem in mikoplazem. Fitoplazme so sčasoma nastale iz aholeplazem, ureaplazme pa iz mikoplazem (Razin,

2006). Nastanek glavnih vej molikutov sovpada s pomembnimi paleontološkim dogodki v zemeljski zgodovini in posledično evolucijo flore in favne, ki je omogočila nastanek habitatov za vsako posamezno vejo (Razin, 2006).

Potrebno je poudariti, da filogenetsko drevo molikutov temelji predvsem na primerjavi sekvenč 16S rDNK. Primerjalne analize sekvenč genov za 16S rRNK so tudi omogočile umestitev do sedaj še negojenih fitoplazem v razred *Mollicutes* (Seemüller in sod., 1994). Zaradi pomembnosti analize ribosomskih sekvenč pri filogeniji, taksonomiji in identifikaciji vrst, je Mednarodni odbor za sistematično bakteriologijo – Podobor za taksonomijo molikutov (ang: International Committee of Systematic Bacteriology – Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes) že leta 1997 priporočil vključitev sekvenč 16S rDNK v opis novih vrst molikutov (Razin, 2006).

Genom molikutov ima značilno nizko vsebnost G+C baznih parov, ki je pri mikoplazmah med 24 in 33 mol %, sama distribucija G+C pa je neenakomerna. Tako je povprečna vsebnost G+C v genomu *M.genitalium* 32 mol %, v rRNK genih te vrste 44 mol % ter v tRNK genih 52 mol % (Razin, 2006). Zaradi takšne razporeditve so posledično pri mikoplazmah pogoste intergenske regije, bogate z AT baznimi pari, včasih celo do 80 – 90 mol % (Razin, 2006). Visoka vsebnost G+C baznih parov v genih za tRNK in rRNK, ki je le za nekaj odstotkov nižja od *E.coli*, kaže na ohranjenost teh genov in biološko pomembnost njihovih produktov.

Zaradi redukcije genoma v evoluciji je prišlo do izgube mnogih genov. Genomske analize *M. genitalium* (Fraser in sod., 1995) in *M. pneumoniae* (Himmelreich in sod., 1996) so pokazale odsotnost genov, vpletenih v biosintetske poti (Razin in sod., 1998). Ti mikoplazmi sta med reduktivno evolucijo izgubili vse gene, vpletene v biosintezo aminokislín, večino genov za biosintezo kofaktorjev (vitaminov), gene za sintezo celične stene in metabolizem lipidov (Razin, 1987). Manjkojo tudi geni za sintezo purinov in pirimidinov, medtem ko so se geni za protvorbo v ribonukleotide in deoksiribonukleotide ohranili (Tham in sod., 1993; Fraser in sod., 1995; Himmelreich in sod., 1996). Tudi število genov, vpletenih v celične procese, kot npr. *fts* geni za delitev celice, heat shock geni, geni za šaperone in sekrecijo proteinov, je pri mikoplazmah manjše v primerjavi z drugimi bakterijami (Razin, 2006).

Že leta 1969 sta Ryan in Morwitz pravilno predvidevala, da je zaradi majhnega genoma molikutov in nizke vsebnosti G+C baznih parov, število kopij rRNK genov v primerjavi z mnogimi prokarionti manjše. Amikam in sodelavci so leta 1984 pokazali, da so pri različnih vrstah iz rodov *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma* in *Ureaplasma* v genomu prisotne le ena ali dve kopije genov za 16S rRNK (Amikam in sod., 1984). Tako imata *Myocplasma capricolum* in *Acholeplasma laidlawii* po dve kopije genov rRNK, *Mycoplasma genitalium* samo eno, *Mycoplasma synoviae* pa ima poleg dveh kopij genov rRNK še dodatno kopijo gena za 5S rRNK (rrnDB, 2008). Geni za posamezne rRNK molekule so pri vseh pregledanih molikutih v operon povezani na tipičen prokariontski način, tj. 5' - 16S - 23S - 5S - 3' (Amikam in sod., 1984).

**Preglednica 2:** Glavne značilnosti in taksonomija razreda *Mollicutes* (Razin, 2006: 837)

| Sistematična skupina  | Lastnosti in habitat   | Velikost genoma(kbp) | DNK (mol % G+C) | Potreba po steroličnih kisicah | Število poznanih vrst |
|---|--|----------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------|
| <b>Domena Bacteria, deblo VIII: Firmicutes – XXI Mollicutes</b> |  |                      |                 |                                |                       |
| <b>družina Mycoplasmataceae</b>                                 |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Mycoplasma</i>   | Optimalna rast pri 37 °C, naseljujejo ljudi in živali                      | 580 - 1350           | 23 - 40         | +                              | 107                   |
| <i>Ureaplasma</i>   | Za rast potrebujejo ureo, naseljujejo ljudi in živali                      | 760 - 1170           | 27 - 30         | +                              | 7                     |
| <b>družina Entomoplasmataceae</b>                               |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Entomoplasma</i>   | Optimalna rast pri 30 °C, naseljujejo insekte in rastline                  | 790 - 1140           | 27 - 29         | +                              | 6                     |
| <i>Mesoplasma</i>   | Optimalna rast pri 30 °C, naseljujejo insekte in rastline                  | 870 - 1100           | 27 - 30         | -                              | 12                    |
| <b>družina Spiroplasmataceae</b>                                |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Spiroplasma</i>  | Helični filamenti, naseljujejo insekte in rastline                         | 780 - 2220           | 24 - 31         | +                              | 34                    |
| <b>družina Acholeplasmatacea</b>                                |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Acholeplasma</i>   | Optimalna rast med 30 in 37 °C, naseljujejo živali in površino rastlin     | 1500 - 1650          | 26 – 36         | -                              | 14                    |
| <b>družina Anaeroplasmataceae</b>                               |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Anaeroplasma</i>   | Obligatni anaerobi, občutljivi na kisik, naseljujejo goveje in ovčje vampe | 1500 - 1600          | 29 – 34         | +                              | 4                     |
| <i>Asteroleplasma</i>   |  | 1500                 | 40              | -                              | 1                     |
| <b>Nedefinirani taksonomski status</b>                          |  |                      |                 |                                |                       |
| <i>Phytoplasma</i>  | Kultivacija zaenkrat ni možna  | 530 - 1185           | 23 - 29         | ND                             | ND                    |

ND – ni določeno

## 2.2 METODE ZA PREUČEVANJE STRUKTURE IN PESTROSTI MIKROBNIH ZDRUŽB IN ODKRIVANJE NOVIH MIKROBNIH VRST V OKOLJU

### 2.2.1 Tradicionalne mikrobiološke metode

Morfologija mikroorganizmov je v primerjavi z rastlinsko in živalsko preveč preprosta, da bi jo v mikrobni taksonomiji lahko uporabili za verodostojno klasifikacijo in zanesljivo identifikacijo. Zato je mikrobna identifikacija do nedavnega temeljila na izolaciji čistih kultur (oziroma definiranih kokultur), čemur je sledilo ugotavljanje in opisovanje številnih biokemičnih in fizioloških lastnosti. Opisovanje novih mikrobnih vrst je bilo tako odvisno predvsem od sposobnosti gojenja mikrobov *in vitro* (Amann in sod., 1995).

Metode, ki temeljijo na gojenju, so v mnogih pogledih pomankljive. Če primerjamo rezultate mikroskopskega štetja mikrobnih celic v različnih neznanih vzorcih s štetjem zraslih kolonij na rastnih gojiščih, mikroskopsko štetje v mnogih primerih za nekaj velikostnih redov presega rezultat, pridobljen z gojitvenimi metodami (Amann in sod., 1995). Staley in Konopka sta leta 1985 ta pojav poimenovala anomalija števnih plošč (ang: Great plate count anomaly). Vzroki za takšne razlike so lahko različni. Gojenje je lahko neuspešno zaradi nepoznavanja prehranskih potreb neznanih organizmov (Amann in sod., 1995), različnih sintrofij med mikrobi samimi ali zaradi prehoda v fiziološko stanje, kjer so mikrobi živi, a se ne delijo (ti. VNC stanje, angl. *Viable but not culturable*) (Savage, 1995). Gojitvene metode zahtevajo tudi veliko časa, zaradi česar omejujejo število vzorcev, ki jih lahko pregledamo, ne podajajo pa tudi nobene informacije o populacijski dinamiki in odzivu združbe na motnje v okolju (Leser in sod., 2002).

Ker je molikute zaradi nenavadnih (in nepoznanih) prehranskih zahtev in specifičnih asociacij z gostitelji težko gojiti, so šele molekularno biološke tehnike na osnovi 16S rRNK pripomogle k odkrivanju novih filotipov (Amann in sod., 1995), omogočile pa so tudi vpogled v evolucijo te nenavadne skupine bakterij.

### 2.2.2 Molekularne metode

Razvoj in vedno bolj pogosta uporaba molekularno bioloških metod pri raziskovanju raznolikosti in ekologije mikroorganizmov v njihovih naravnih okoljih sta privedla do odkritja mnogih, poprej neznanih mikroorganizmov in do novih spoznanj o sestavi mikrobnih združb v številnih ekosistemih (Head in sod., 1998). Metode, ki temeljijo na analizi nukleinskih kislin, so pripomogle k hitremu in specifičnemu odkrivanju mikroorganizmov v okoljskih vzorcih in mešanih kulturah, s tem pa so omogočile nov vpogled v ekologijo, evolucijo in pestrost same združbe (Head in sod., 1998).

Pri preučevanju mikrobne pestrosti, taksonomije, evolucije in ekologije, ki so že od nekdaj tesno prepletene v mikrobiologiji (Woese in sod., 1987; Woese in sod., 1977), so se za zelo primerne izkazali geni za ribosomske RNK (rRNK). Molekula RNK je prisotna v vseh oblikah življenja, zato lahko primerjalne analize njihovih sekvenč uporabimo za ugotavljanje sorodstvenih odnosov med organizmi (Head in sod., 1998). Najprej so proučevali gene za molekule 5S rRNK iz velike podenote ribosoma, ki pa so zaradi svoje majhne informativne vrednosti (dolge so 120 nt), primerne le za preučevanje manj kompleksnih okoljskih vzorcev (Amann in sod., 1995). Olsen in sodelavci so leta 1986 predlagali uporabo genov za večji RNK molekuli. Danes uporablajo predvsem sekvenč genov za 16S rRNK (ssuRNA, ang.: Small SubUnit RNA), ki so v povprečju dolge 1500 nt in vsebujejo dovolj informacij za zanesljive filogenetske analize (Amann in sod., 1995). Dodaten zagon v molekularni biologiji je vsekakor povezan z odkritjem verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki je omogočila pomnoževanje delov DNK direktno iz okoljskih vzorcev, zagotovila pa je tudi zadostne količine DNK za njihovo preučevanje (Saiki in sod., 1988).

Zaradi vse pogostejše uporabe molekularnih metod, ki temeljijo na uporabi genov za manjšo podenoto ribosoma, je prišlo do hitrega kopiranja tovrstnih podatkov na svetovnem spletu. Specializirana spletna baza podatkov Ribosomal Database Project do danes vsebuje že več kot 400000 sekvenč genov za 16S rRNK, ponuja pa tudi orodja za analizo ter filogenetsko in taksonomsko uvrstitev (Cole in sod., 2005). Poleg dostopa do hierarhično urejenih sekvenč 16S rRNK, lahko z orodjem ProbeMatch preverjamo ustreznost ribosomskih sond, z orodjem Sequence Match poiščemo najbolj sorodne sekvenče iz baze

podatkov ter z orodjem RDP Classifier filogenetsko umestimo novo sekvenco v obstoječo hierarhijo (Cole in sod., 2005). Zelo uporabna so tudi orodja za preverjanje potencialnih himernih sekvenc in izris filogenetskih dreves (Maidak in sod., 1997). Najnovejša verzija RDP (RDP-II) je nadgrajena s tremi dodatnimi filterji, ki uporabniku omogočajo pregledovanje sekvenc glede na dolžino (sekvence večje ali manjše od 1200 nt), iskanje sekvenc izoliranih in gojenih mikroorganizmov ali samo okoljskih sekvenc, ter vključevanje samo tipskih sekvenc sevov (Cole in sod., 2005). Sekvene genov za 16S RNK v RDP vključujejo iz dveh največjih splošnih sekvenčnih podatkovnih baz GenBank (Benson in sod., 2006) in EBI.

Podatki iz sekvenčne baze GenBank so dostopni tudi preko spletne strani Nacionalnega centra za biotehnološke informacije (ang.: National Center for Biotechnology Information oz. NCBI), ki podobno kot RDP-II, nudi orodja za analizo nukleotidnih sekvenc. Z iskalcem PubMed je možen tudi dostop do citatov iz različnih znanstvenih revij, mnogih povzetkov ter tudi celotnih člankov (Wheeler in sod., 2006).

Za analize nukleotidnih sekvenc so raziskovalci razvili več računalniških programov. Programske pakete MEGA (ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis), ki je brezplačno dostopen na spletu, omogoča ocenjevanje evolucijskih distanc, rekonstrukcijo filogenetskih dreves in računanje osnovnih statističnih podatkov (Kumar in sod., 1994). Pri ocenjevanju evolucijskih razdalj med nukleotidnimi in aminokislinskimi sekvencami lahko izbiramo med različnimi metodami izračunov. Pri izrisu filogenteskih dreves so na izbiro metode UPGMA, Neighbour joining in Maximum parsimony ter dva statistična testa topoloških razlik (Kumar in sod., 1994).

Zaradi vedno večje potrebe po novih in/ali bolj specifičnih oligonukleotidnih sondah in začetnih oligonukleotidih je prišlo tudi do razvoja programske opreme, ki iskanje le-teh izboljša in poenostavi. PRIMROSE je računalniški program za pripravo 16S rRNA sond za hibridizacijo in začetnih oligonukleotidov za PCR, ki se uporablja kot filogenetska in ekološka orodja v mikrobiologiji (Ashelford in sod., 2002). PRIMROSE išče uporabne oligonukleotide na osnovi podatkov iz baze ribosomskih sekvenc RDP-II. Ker lahko specifičnost tako pridobljenih oligonukleotidnih sond dodatno preverimo tako v samem programu, kot tudi z orodjem ProbeMatch (RDP-II), je odkrivanje in priprava ustreznih

oligonukleotidov relativno preprosta. Prednost tega programa je tudi možnost izdelave lastne podatkovne baze, v kateri uporabnik sam definira tarčne sekvene. *In silico* primerjave oligonukleotidov, pridobljenih s programom PRIMROSE, z že znanimi oligonukletidi, ki so trenutno v uporabi, so pokazale, da so s tem programom pripravljeni oligonukleotidi pogosto bolj specifični (Ashelford in sod., 2002). Tudi program PRIMROSE je brezplačno dostopen na spletu.

Kljub temu, da predstavljajo molekularne metode od gojitve neodvisno alternativo tradicionalnim tehnikam, pa je potrebno poudariti, da ne morejo povsem nadomestiti metod izolacije in nadaljnje biokemijske in fiziološke karakterizacije (Amann in sod., 1995).

## 2.3 NOVE MIKOPLAZME IZ PREBAVIL ŽIVALI

Mikroskopska štetja mikroorganizmov v prebavilih človeka kažejo, da od 60 do 80 % opaženih bakterij ne moremo kultivirati (Suau in sod., 1999). Zaradi pogostejše uporabe molekularno bioloških pristopov pri raziskovanju prestrosti mikrobnih združb v različnih ekosistemih, so v zadnjih letih odkrili poprej neznane molikutske sekvene v prebavilih lososov (Holben in sod., 2002), človeka (Suau in sod., 1999), gorile (Frey in sod., 2006), prašičev (Leser in sod., 2002), konjev (Daly in sod., 2001), v vampu prežvekovalcev (Ozutsumi in sod., 2005; Tajima in sod., 1999), ter v prebavilih termitor (Hongoh in sod., 2006) in kopenskih rakov (Kostanjšek in sod., 2003; Wang in sod., 2004).

### 2.3.1 Molikuti 'Skupine A'

Skupino A so prvi omenili Leser in sodelavci, ki so 8 filotipov iz prašičjega prebavnega trakta umestili v samostojno evolucijsko vejo znotraj molikutov (Leser in sod., 2002). Uvrstitev blizu rodov *Mycoplasma* in *Spiroplasma* je bila podprta z visoko bootstrap vrednostjo (90 %), podobnost sekvenc Skupine A z ostalimi znanimi bakterijskimi sekvencami pa je bila nizka (Leser in sod., 2002). V to vejo so se poleg omenjenih filotipov uvrstile tudi 16S rDNK sekvene iz kravjega vampa (Tajima in sod., 1999) in

črevesja človeka (Suau in sod., 1999). Znotraj skupine A podobnost med sekvencami variira od 75,5 do 96,4 %. Ta zgodnja evolucijska veja znotraj *Mollicutes* najverjenteje predstavlja raznolik takson nad nivojem vrste. Ker še noben predstavnik Skupine A ni bil vzgojen v *in vitro* laboratorijskih razmerah, je nemogoče predvidevati njihov fenotip in vlogo v prebavilih. A ker vsi filotipi izhajajo iz prebavnega trakta ljudi, prašičev in vampa goveda, lahko predvidevamo, da so povezani z gastrointestinalnim ekosistemom (Leser in sod., 2002).

### **2.3.2 'Candidatus Bacilloplasma'**

Tudi prebavni sistem členonožcev je pogosto habitat molikutov. Različne vrste členonožcev naseljujejo spiroplazme, mezoplazme, entomoplazme in fitoplazme (Razin, 2006). Kostanjšek in sodelavci (2004) so v papilatni regiji zadnjega dela prebavila kopenskega izopodnega raka *Porcellio scaber* opazili prisotnost filamentoznih bakterij, ki so pritrjene na kutikularne trne prebavil. Analiza 16S rRNK sekvenc in izris filogenetskega drevesa sta pokazala, da bakterije iz prebavil *P. scaber* tvorijo ločeno, evolucijsko zgodnjo vejo znotraj razreda *Mollicutes* (Kostanjšek in sod., 2003). Ker so bile molikutske 16 S rRNK sekvence iz papilatne regije zadnjega prebavila *P. Scaber* najbolj podobne tistim iz Skupine A, so Kostanjšek in sodelavci predlagali začasno ime Podskupina A1 (Kostanjšek in sod., 2004). Lokalizacijo in distribucijo filamentoznih bakterij so ugotovili s flourescentno *in situ* hibridizacijo in predlagali ime '*Candidatus Bacilloplasma*', ki se nanaša na njihovo paličasto obliko (Kostanjšek in sod., 2007).

### **2.3.3. 'Candidatus Hepatoplasma crinochetonum'**

Leta 2004 so v hepatopankreasu kopenskega raka *P. scaber* odkrili tudi 16S rRNK sekvence neznane in negojene skupine mikroorganizmov, ki so jo Wang in sod. identificirali s kloniranjem in sekvenciranjem genov za malo podenoto ribosoma. Filogenetske analize so pokazale, da tudi ti simbionti predstavljajo novo vejo molikutov in so le delno sorodni s predstavniki redov *Mycoplasmatales* in *Entomoplasmatales* (Wang in sod., 2004). S flourescentno *in situ* hibridizacijo so potrdili, da odkrite 16S rRNK sekvence

izhajajo iz površine epitelija v hepatopankreasu, z isto sondo pa so identične simbionte odkrili tudi pri drugih izopodih iz taksona *Crinocheta* (Wang in sod., 2004). Avtorji so za novo vejo molikutov predlagali ime '*Candidatus Hepatoplasma crinochetorum*' (Wang in sod., 2004).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

Vzorce prašičjega blata smo dobili iz prašičje farme v Ihanu. Druge fekalne vzorce (konj, koza, ovca, krava, človek) smo odvzeli po iztrebljanju in jih shranili v sterilnih mikrocentrifugirkah. Do uporabe smo vzorce shranili pri -20 °C

**Preglednica 3:** Seznam živali, katerih vzorce blata smo uporabili za osamitev skupne DNK

| Oznaka | Vrsta                        | Slovensko ime | Vzorec       |
|--------|------------------------------|---------------|--------------|
| P1     | <i>Sus scrofa domesticus</i> | domači prašič | blato        |
| P2     | <i>Sus scrofa domesticus</i> | domači prašič | blato        |
| P3     | <i>Sus scrofa domesticus</i> | domači prašič | blato        |
| OF     | <i>Ovis aries</i>            | domača ovca   | blato        |
| KO     | <i>Equus caballus</i>        | domači konj   | blato        |
| KZ     | <i>Capra aegagrus hircus</i> | domača koza   | blato        |
| KR     | <i>Bos taurus</i>            | domače govedo | blato        |
| NF     | <i>Homo sapiens</i>          | človek        | blato        |
| MF     | <i>Homo sapiens</i>          | človek        | blato        |
| JF     | <i>Homo sapiens</i>          | človek        | blato        |
| B1     | <i>Bos taurus</i>            | domače govedo | vamp         |
| B2     | <i>Bos taurus</i>            | domače govedo | vamp         |
| B3     | <i>Bos taurus</i>            | domače govedo | vamp         |
| 12K    | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | kunec         | debelo črevo |
| 12SL   | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | kunec         | slepo črevo  |

Za osamitev skupne mikrobne DNK smo uporabili približno 0,5 ml vzorca blata. V raziskavo smo vključili tudi že prej osamljeno in očiščeno skupno mikrobno DNK iz vampa domačega goveda ter iz slepega črevesa in debelega črevesa kunca (Interni vzorci, 2007).

### **3.1.2. Kompleti**

Komplet za čiščenje PCR pomnožkov: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)

### **3.1.3 Raztopine in pufri**

| <b>Ime</b>       | <b>Sestava</b>   |
|------------------|--|
| pufer TE, pH 8,0 | 10 mM Tris-HCL, pH 8,0<br>1 mM EDTA, ph 8,0                |
| pufer TBE 0,5x   | 0,045 M Tris-borat<br>0,001 M EDTA, pH 8,0                 |
| CTAB/NaCl        | 10 % (w/w) heksadeciltrimetilamonijev bromid<br>0,7 M NaCl |

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Izolacija skupne mikrobne DNK

Za izolacijo skupne mikrobne DNK smo uporabili delno spremenjeno metodo s krogličnim stresalcem (»beatbeater«) in CTAB, ki so jo opisali Ausubel in sodelavci (1999). V sterilne mikrocentrifugirke, ki so vsebovale mešanico različno velikih cirkonij - silikagelnih krogljic (premera 0,5 mm in 0,1 mm) (Biospec Products, Bartsville, ZDA), smo dodali vzorce blata poskusnih živali (približno 0,5 ml) in 570 µl pufra TE. Vzorce smo homogenizirali s stresanjem na krogličnem stresalcu (Mini-beadbeater 3110BX, Biospec Products, Bartsville, ZDA) 3-krat po 30 sekund, med stresanjji pa mikrocentrifugirke hladili na ledu. Po stresanju smo dodali 100 µl 5 M NaCl in 80 µl 10 % CTAB v 0,7 % NaCl (predhodno segretega na 65 °C), premešali in inkubirali 10 min pri 65 °C. Po inkubaciji je sledila ekstrakcija DNK v enakem volumnu kloroforma (digestorij). Sledilo je 10 min centrifugiranja pri pospešku 12000 x g. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in ji dodali enako količino FKI (fenol : kloroform : izoamilalkohol = 25 : 24 : 1) in mešanico ponovno centrifugirali 10 min pri 12000 x g. V vodni fazi raztopljeni nukleinske kisline smo oborili z 0,6-kratnim volumnom izopropanola. Po 15 min centrifugiranja pri 14000 x g, smo supernatant odstranili in s stene mikrocentrifugirke sprali usedlino z 1 ml 70 % ledeno hladnega etanola. Mešanico smo nato 10 min centrifugirali s pospeški 14000 x g pri temperaturi 4 °C. Po odstranitvi supernatanta smo usedlino posušili v brezprašni komori (laminariju), nato pa nukleinske kisline raztopili v 35 µl TE pufra. Raztopino izolirane skupne DNK smo do uporabe shranili pri -20 °C.

#### 3.2.2 Priprava ustreznih začetnih oligonukleotidov

Sekvence genov 16S rRNA smo v FASTA formatu pridobili iz spletne baze podatkov RDP-II. Sekvence smo s programom ClustalW (programski paket MEGA) poravnali in ročno pregledali. Za izris filogenetskega drevesa smo uporabili metodo združevanja sosedov (ang.: Neighbour joining), za izračun oddaljenosti (distance) med sekvencami pa smo uporabili Kimurin dvoparametrični algoritem (oba programa sta vključena v

programskega paket MEGA). Tako smo opredelili filogenetski položaj organizmov mikoplazemske Skupine A in njihovih najbližjih sorodnikov. Za ocenitev kvalitete dobljenega filogenetskega drevesa smo uporabili metodo vezanja (ang.: bootstrapping), ki je prav tako vključen v MEGA. Za izdelavo specifičnih začetnih oligonukleotidov smo uporabili program PRIMROSE (Ashelford in sod., 2002).

Za ugotavljanje specifičnosti kombinacije delno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo v programu Microsoft Excel z orodjem VLOOKUP izračunali presek števil (imen) sekvenc, ki jih najde vsak posamezen začetni oligonukleotid.

### **3.2.3 Pomnoževanje bakterijskih genov 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

Za pomnoževanje tarčnih odsekov genov za 16S rRNK smo uporabili termostata My Cycler<sup>TM</sup>, thermal cycler (BioRad, ZDA) in GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems, ZDA). Reakcijske mešanice smo pripravljali v 200 µl mikrocentrifugirkah (MicroAmp, Elmer Perkin, ZDA).

Reakcijske mešanice za PCR z evolucijsko ohranjenima bakterijskima začetnima oligonukleotidoma (F968-GC in 1401R), so vsebovale 2 µl 10-kratnega *Taq* pufra in 0,2 mM mešanico deoksiribonukleozidov (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1,6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (končna koncentracija 2 mM), 0,6 enote rekombinantne *Taq* polimeraze DNK (vse Fermentas, ZDA), 6 pmol vsakega začetnega oligonukleotida in 1 µl vzorca skupne mikrobne DNK. Volumen mešanice smo do 20 µl dopolnili s sterilno destilirano vodo (Sigma, ZDA).

Reakcijske mešanice za PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za molikute skupine A (MolA352f in MolA1224r), so vsebovale 2 µl 10-kratnega *Taq* pufra, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,6 enote rekombinantne *Taq* polimeraze, 0,2 mM mešanice deoksiribonukleozidov (vse Fermentas, ZDA), 4 pmol vsakega začetnega oligonukleotida, in 1 µl skupne mikrobne DNK. Volumen mešanice smo s sterilno destilirano vodo (Sigma, ZDA) dopolnili do 20 µl.

Za določitev temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, specifičnih za skupino A, smo uporabili PCR z gradientno temperaturo (55 °C, 52,0 °C, 51 °C, 46,9 °C, 45 °C).

**Preglednica 4:** Seznam in značilnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov

| Oznaka            | Zaporedje  | Tarčno mesto v genu za 16S rRNK | Vir                    |
|-------------------|--|---------------------------------|------------------------|
| <b>F968-GC</b>    | 5' - ggcccgggcgccggggggggggggcacgg<br>ggcgAACGCGAAGAACCTTAC - 3' | 968 - 984                       | Nübel in<br>sod., 1996 |
| <b>1401R</b>      | 5' - CGGTGTGTACAAGACCC - 3'                                      | 1385 - 1401                     | Nübel in<br>sod., 1996 |
| <b>GPO-1e</b>     | 5' - ACGGCCCADACTYCTACGGRAGGCA<br>GCAGTA - 3'                    | 326 - 356                       | Kong in<br>sod., 2001  |
| <b>MGSO-e1</b>    | 5' - CCRTGCACCAYCTGTMWHHBGWW<br>AACCTC - 3'                      | 1049 - 1020                     | Kong in<br>sod., 2001  |
| <b>MolA 352f</b>  | 5' - CAGCAGTTAGGAATA - 3'  | okoli 352                       | to delo                |
| <b>MolA 1224r</b> | 5' - TTRTAGCACRCCTGT - 3 <sup>a</sup>                            | Okoli 1224                      | to delo                |

a – A ali G

**Preglednica 5:** PCR protokoli

| PROTOKOL                            | I.                | II.                | III.                     |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|
| Začetna oligonukleotida             | F968 – GC / 1401R | GPO-1e/<br>MGSO-e1 | MolA 352f/<br>MolA 1401r |
| Dolžina PCR produkta (bp)           | 433               | 724                | ≈880                     |
| Začetna denaturacija 94 °C (s)      | 180               | 180                | 180                      |
| Denaturacija 94 °C (s)              | 30                | 45                 | 30                       |
| Prileganje T/t ( °C/s)              | 56/30             | 60/30              | 47/45                    |
| Polimerizacija 72 °C (s)            | 90                | 60                 | 90                       |
| Podaljšana polimerizacija 72 °C (s) | 600               | 600                | 600                      |
| Število ciklov                      | 25                | 35                 | 35                       |

### 3.2.4 Restrikcija dobljenih PCR pomnožkov

Za *in silico* iskanje ustrezne restrikcijske endonukleaze za restrikcijo pomnoženih delov genov za 16S rRNA smo uporabili spletno orodje NEBcutter V2.0.

Za restrikcijo smo pripravili 100 µl reakcijske mešanice za PCR z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r. Končne koncentracije reagentov so bile enake kot pri pripravi 20 µl reakcijskih mešanic. Pred samo restrikcijo smo PCR pomnožke prečistili s kompletom za čiščenje PCR pomnožkov in prečiščene pomnožke raztopili v 75 µl 10 mM Tris-HCl pufra (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Mannheim, Nemčija). Po pomoževanju z verižno reakcijo s polimerazo smo uspešnost reakcije preverjali z 1 % agarozno gelsko elektroforezo, za kar smo porabili 5 µl PCR pomnožkov, enak volumen pa smo porabili tudi za agarozno gelsko elektroforezo po čiščenju. Preostale (prečiščene) PCR pomnožke (90 µl) smo pri temperaturi 45 °C skoncentrirali v vakuumski centrifugi za koncentracijo vzorcev Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Kanada). Končni volumen skoncentriranih vzorcev je bil približno 10 µl (približno 9-krat skoncentrirani vzorci).

Reakcijske mešanice smo pripravili v mikrocentrifugirkah. Vsebovale so 2 µl 10-kratnega restrikcijskega pufra (Pufer B), 10 enot restrikcijske endonukleaze *PaeI* (Fermentas, ), 5 µl koncentriranih pomnožkov DNK in 12 µl sterilne destilirane vode. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl. Restrikcija je potekala čez noč pri temperaturi 37 °C. Reakcijo smo ustavili tako, da smo reakcijske mešanice 10 min inkubirali pri temperaturi 65 °C.

### 3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Za odkrivanje pomnožkov PCR smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili z razapljanjem utrezne količine agaroze Seakem® LE Agarose (Cambrex Bio Science Rochland Inc., Rochland, USA) v 0,5-kratnem pufru TBE. Koncentracija agaroze v gelu je bila 1 % (w/v). Polimerizacija je potekala pri sobni temperaturi. Elektroforetsko ločevanje je potekalo v 0,5-kratnem pufru TBE pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gele 15-30 min barvali v raztopini etidijevega bromida (1 µg/ml) in jih

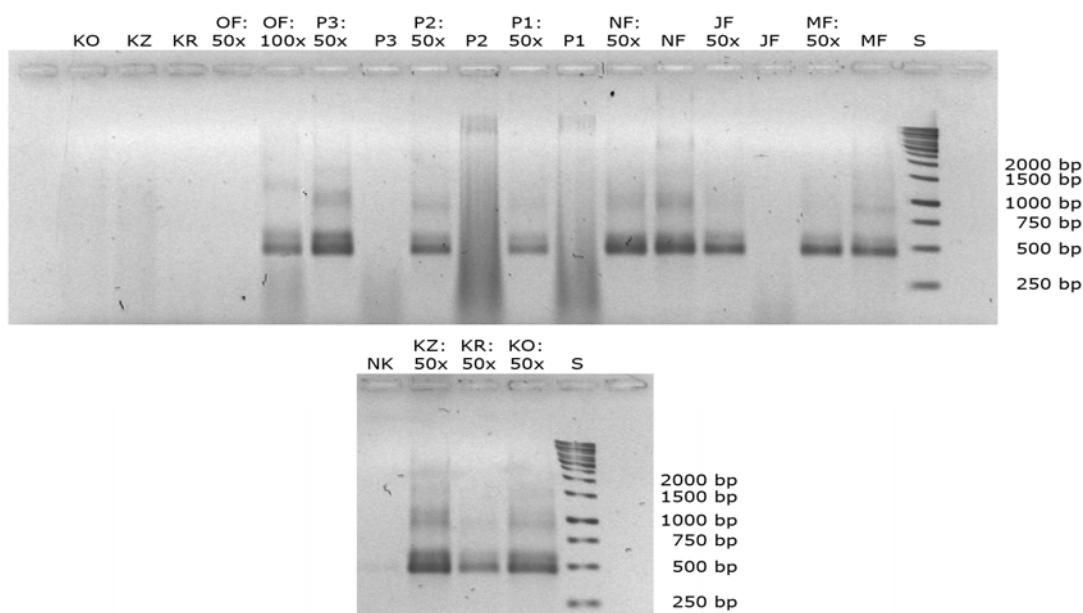
nato za 20-30 min pustili v destilirani vodi, da se razbarvajo. Gele smo pregledovali v transiluminatorju Gel Doc 1000 s sistemom za zajemanje in obdelavo slike Molecular Analyst 1.4 (vse BioRad, Hercule, ZDA).

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZOLACIJA SKUPNE MIKROBNE DNK IN NJENA PRIMERNOST ZA MOLEKULARNO BIOLOŠKE ANALIZE

Primernost osamljene skupne DNK za molekularno biolološke analize smo preverjali z verižno reakcijo s polimerazo, pri kateri smo za pomnoževanje delov genov za 16S RNK uporabili evolucijsko ohranjena, širokospecifična bakterijska začetna oligonukleotida F968-GC in 1401R.

Vzorce osamljene DNK smo po potrebi redčili.



**Slika 2:** Na 1 % agarozni gel naneseni PCR pomnožki 16S rDNK iz vzorcev blata konja (KO), koze (KZ), krave (KR), ovce (OF), treh prašičev (P1, P2, P3) in treh ljudi (NF, JF, MF). S je velikostni standard 1kB 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). NK je negativna kontrola PCR reakcije, namesto DNK v reakcijsko mešanico dodan TE pufer. Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitve vzorcev osamljenih celokupnih DNK. Na gel smo nanesli 5 µl vsakega PCR produkta.

Pomnožke genov za 16S rRNK ustrezne velikosti (približno 450 nt) smo dobili pri vseh pregledanih vzorcih (blato ljudi: NF, MF, JF; blato prašičev: P1, P2, P3; blato ovce: OF; blato koze: KZ; blato krave: KR; blato konja: KO), vendar pri večini le takrat, ko smo uporabili ustrezno razredčeno DNK. Potrdili smo, da je bila osamitev skupne mikrobne

DNK iz vseh vzorcev uspešna. Neostre lise so lahko posledica nespecifičnega podvajanja med verižno reakcijo s polimerazo, ki je lahko posledica prevelike količine matrične DNK, prenizke temperature prileganja ali prevelikega števila ciklov. Bolj verjetna razloga pa je, da smo s širokospecifičnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili gene za 16S rRNK mnogih različnih mikroorganizmov, med katerimi imajo nekateri zaradi evolucijskih mutacij (insercij/delecij) sekvenco genov za 16S rRNK krajšo ali daljšo. Ta fenomen je poznan in celo osnova za eno od tipizacijskih tehnik v molekularni mikrobiologiji, imenovano LH-PCR (ang: Length Heterogeneity PCR) (Suzuki in sod., 1998).

#### 4.2 PRIPRAVA USTREZNIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA ODKRIVANJE MOLIKUTOV IZ SKUPINE A

Najprej smo dele genov za 16S rRNK molikutov 'Skupine A' namnoževali z začetnima oligonukleotidoma GPO-1e in MGSO-e1 (Kong in sod., 2001), ki sta po navedbah avtorjev specifična za večino molikutov. Ker s tem parom začetnih oligonukleotidov kljub večratnim poskusom nismo uspeli pomnožiti tarčnih sekvenč iz naših vzorcev (rezultati niso prikazani), smo z *in silico* analizo preverili njuno ustreznost. Analize so pokazale, da GPO-1e in MGSO-e1 za pomnoževanje 'Skupine A' nista primerna (Preglednica 6), zato smo se odločili, da izdelamo nove začetne oligonukleotide, specifične samo za 'Skupino A'.

Kot je razvidno iz preglednice 6, se napake pri naleganju začetenega oligonukleotida GPO-1e pojavljajo pri vseh sekvenkah 16S rRNK, ki so jih Leser in sodelavci (2002) opredelili kot Skupino A, pri desetih sekvenkah sta napaki pri naleganju dve, pri eni (AF371529) je napaka ena, pri dveh sekvenkah pa se pojavi kar tri napake (AF132232, AF132233). Pri sekvenkah kandidatne skupine '*Candidatus Bacilloplasma*' je napak pri naleganju še več, pri eni sekvenči je tako napak kar pet (AF395313), sledijo še sekvence z štirimi (AF395322), tremi (DQ340200) in dve z dvema napakama.

Pri začetnem oligonukleotidu MGSO-e1 je napak pri naleganju pri vseh sekvenkah manj, kar je verjetno posledica njegove 12-kratne degeneriranosti. Kljub temu, pa je pri eni sekvenči iz Skupine A (AF132232) napak kar osem, pri eni sekvenči sta napaki dve (AF371526), pri petih sekvenkah je napaka ena, pri preostalih petih sekvenkah pa ta

začetni oligonukleotid nalega brez napake. V skupini '*Candidatus Bacilloplasma*' se pri dveh sekvenah pojavi po ena napaka pri naleganju začetnega oligonukleotida MGSO-e1 (AF395319 in DQ340200), pri eni dve napaki (AF395315), pri preostalih dveh sekvenah pa začetni oligonukleotid prilega brez napake.

Na podlagi rezultatov iz preglednice 6 smo najprej poskusili obo začetna oligonukleotida modifcirati tako, da nalegata tudi na sekvene Skupine A. Preverjanje specifičnost modifciranih začetnih oligonukleotidov z orodjem ProbeMatch (rezultati niso prikazani) pa je pokazalo, da spremembe močno povečajo število nespecifičnih zadetkov (izven razreda *Mollicutes*), zato smo sklenili, da ustrezne začetne oligonukleotide izdelamo sami.

**Preglednica 6:** Prikaz napak pri naleganju začetnih oligonukleotidov GPO-1e in MGSO-e1 na tarčne 16S rRNK sekvene, ki so jih kot Skupino A opredelili Leser in sod. (2002) ter na 16S rRNK sekvene iz '*Candidatus Bacilloplasma*'

| Začetni oligonukleotid                 | GPO 1e (Kong in sod., 2001)   | MGSO e1 (Kong in sod., 2001) <sup>a</sup>   |
|--|---|---|
|  | ACGGCCCADACTYCTACGGRAGGCAGCAGTA   | GAGGTTWWCVDDDWKACAGRTGGTCAYGG   |
| <b><i>Candidatus Bacilloplasma</i></b> |   |   |
| AF395313                               | ACGGCCCAGAC <b>A</b> ACTAC <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b> GGCAGCAGTA   | GAGGTTATCAGGGTGACAGATGGTCATGG   |
| AF395316                               | ACGGCCCAGAC <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>A</b>   | GAGGTTATCAGGGTGACAGATGGTCATGG   |
| AF395319                               | ACGGCCCAGAC <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>A</b>   | GAGG <b>C</b> TATCAGAATGACAGGTGGTCATTG  |
| AF395322                               | ACGGCCCAGAC <b>A</b> ACTAC <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b> GGCAGCAGTA   | GAGGTTATCAGGGTGACAGATGGTCATGG   |
| AF395315                               | ACGGCCCAGAC <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>A</b>   | GAGG <b>C</b> TATCAGAAC <b>C</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| DQ340200                               | ACGG <b>T</b> <b>C</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>A</b> | GAGG <b>C</b> TATCAGAAC <b>C</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| <b>Skupina A</b>                       |   |   |
| AF001742                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>   |
| AF132232                               | ACGGCCCAA <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>  | <b>T</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> |
| AF371528                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>   |
| AF371527                               | ACGGCCCAA <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>  | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF001741                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAT <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371529                               | ACGGCCCAA <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAT <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371526                               | ACGGCCCAA <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>  | GAGGTTAT <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>                                     |
| AF001770                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>   |
| AF132233                               | ACGG <b>T</b> <b>C</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>                   | GAGGTTAT <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371525                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371524                               | ACGGCCCAA <b>A</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>C</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>  | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371523                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |
| AF371522                               | ACGGCCCAGACTCCTACGGGAG <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>T</b>   | GAGGTTAC <b>C</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>G</b>  |

a-reverzni komplement začetnega oligonukleotida MGSO e1

D = A ali G ali T

Y = C ali T

R = A, G

M = A ali C

W = A ali T

H = A ali C ali T

B = C ali G ali T

V = A ali C ali G

K = T ali G

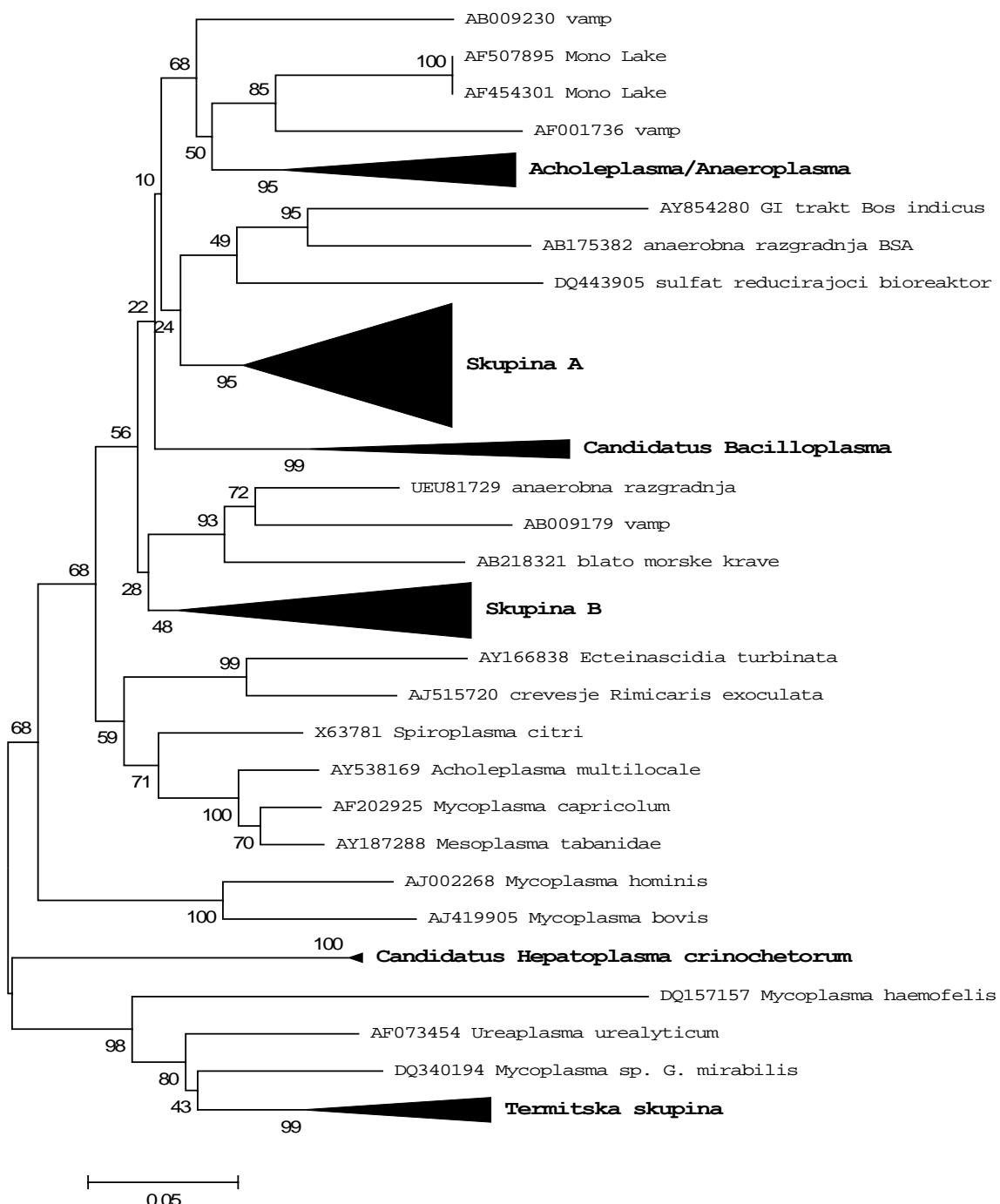
#### **4.2.1 Filogenetska opredelitev molikutov Skupine A**

V nabor sekvenč 16S rRNK za izdelavo začetnih oligonukleotidov smo vključili sekvenč, ki so jih Leser in sod. (2002) opredelili kot Skupino A, sekvenč 'Candidatus *Bacilloplasma*' (Kostanjšek in sod., 2007) iz *P. scaber* in le tej sorodno sekvenč iz prebavil ribe *Gillichthys mirabilis* (DQ340200), ki so jih Kostanjšek in sodelavci opredelili kot Skupino A1 (Kostanjšek in sod., 2004), sekvenč novo opisane kandidatne molekulske vrste *Candidatus Hepatoplasma crinochetonum* (Wang in sod., 2004) ter sekvenč vseh glavnih skupin molikutov (*Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Ureaplasma*). Ker so filogenetske analize (to delo) pokazale, da se v Skupino A uvrščajo tudi dodatne 16S rRNK sekvenč iz prebavil ljudi (Gill in sod., 2006; Eckburg, 2005; Ley in sod., 2005; Ozutsumi in sod., 2005; Turnbaugh in sod., 2006), termitov (Hongoh in sod., 2006), kokoši (Lu in sod., 2003; Bjerrum in sod., 2006), goril (Frey in sod., 2006), podgan (Brooks in sod., 2003), konjev (Simpson in sod., 2004), in celo iz ustne votline ljudi (Kazor in sod., 2003), smo pri izdelavi začetnih oligonukleotidov uporabili tudi te sekvenč, ki večinoma izhajajo iz RDP gruče neidentificiranih molikutov in firmikutov.

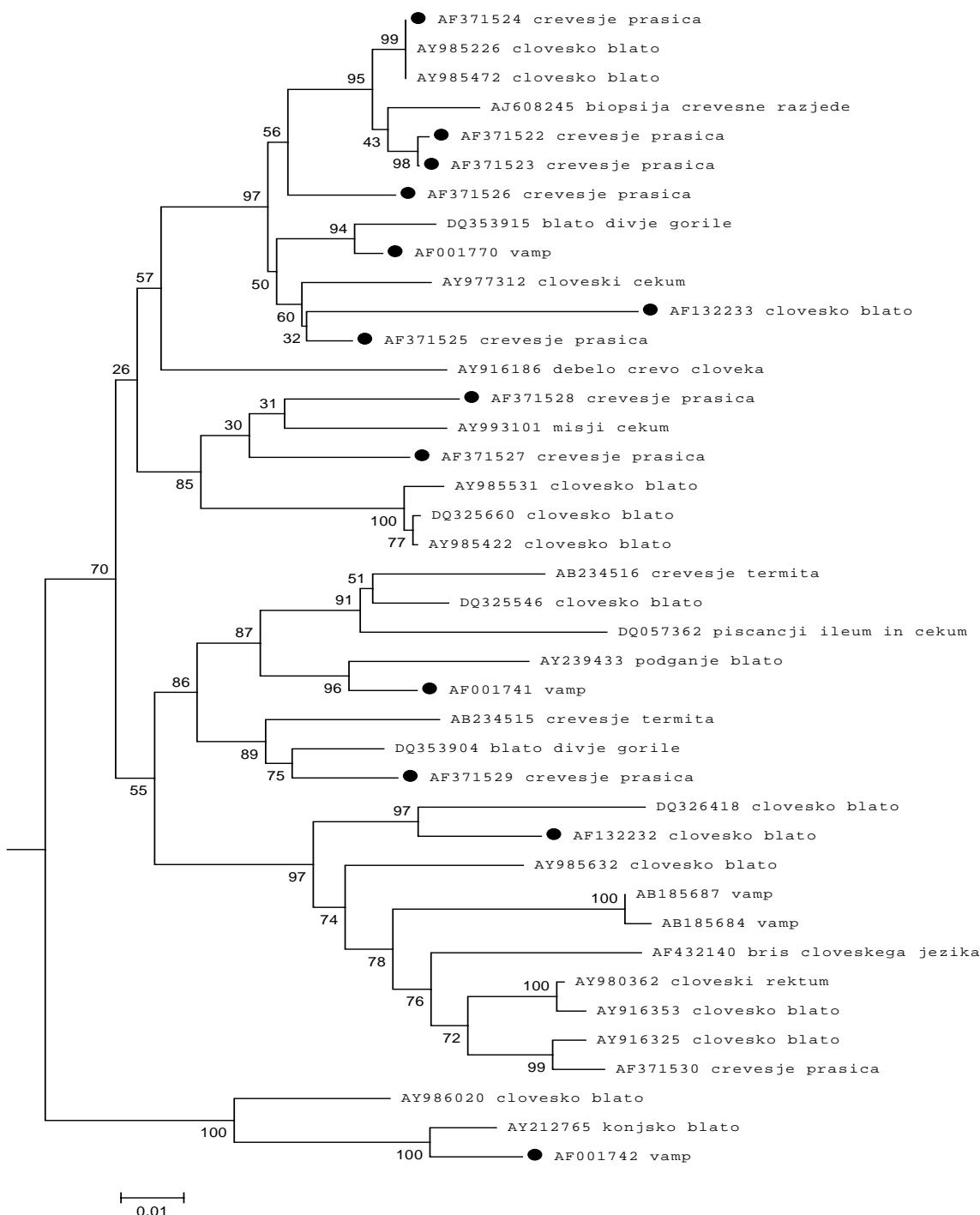
Filogenetske analize so pokazale, da molikuti iz Skupine A tvorijo ločeno vejo, kar potrjuje tudi visok odstotek ponovljivosti vozlišč (95-odstotkov), ki to skupino jasno loči od ostalih sekvenč (Slika 3). Same pozicije molikutov iz Skupine A znotraj razreda *Mollicutes* na podlagi naših analiz ne moremo določiti, saj so ponovljivosti vozlišč premajhne. Iz filogenetskega drevesa je tudi razvidno, da 'Candidatus *Bacilloplasma*' (Skupina A1) ni podskupina Skupine A, kot so prvotno predvidevali Kostanjšek in sodelavci (2004), kar so avtorji ugotovili tudi že sami (Kostanjšek in sod., 2007). Kot kažejo rezultati filogenetske analize, se poleg Skupine A pojavljajo tudi druge molikutske skupine, ki naseljuje prebavni ekosistem različnih živali. Znotraj same Skupine A so ponovljivosti nekaterih vozlišč majhne, a za naše raziskave je bilo (zaenkrat) predvsem pomembno to, da se sekvenč, na osnovi katerih smo izdelali začetne oligonukleotide, dovolj zanesljivo uvrščajo v Skupino A.

Izračun distanc med izbranimi sekvenčami (Slika 5 in Preglednica 7) je pokazal, da je 16S rRNK sekvenči Skupine A (AF001742) najbolj podobna 16S rRNK sekvenča *Acholeplasma modicum* (M23933), sekvenči se razlikujeta v 23-odstotkih zaporedja 16S

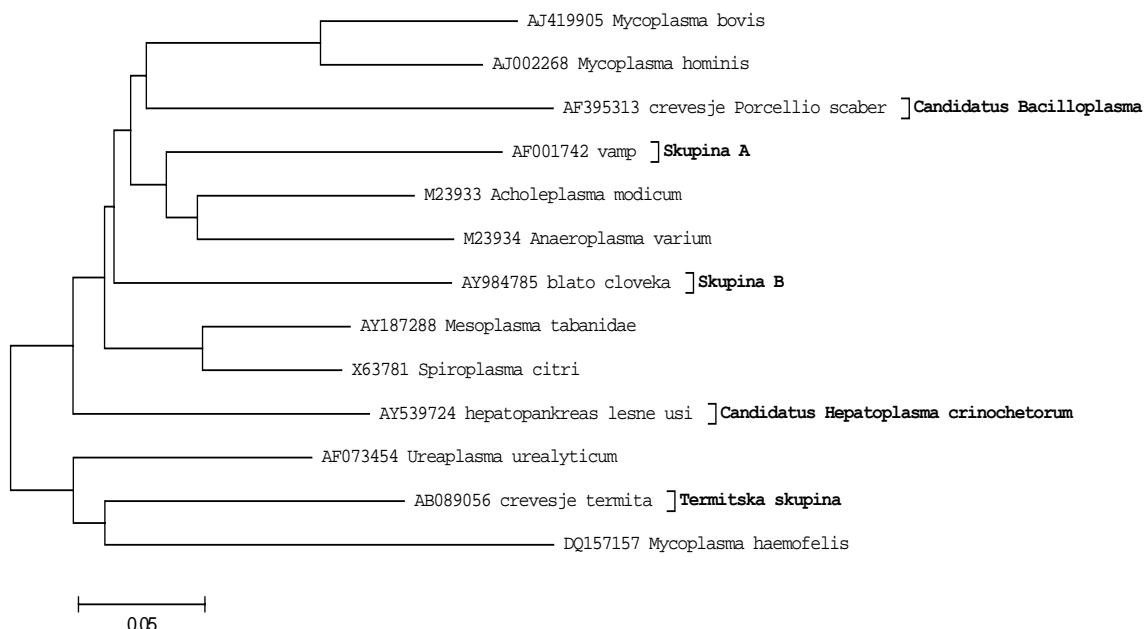
rRNK genov, sledijo *Anaeroplasma varium* (M23934), *Spiroplasma citri* (X63781) in *Mesoplasma tabanidae* (AY187288) z 25-odstotno razliko, najmanj podobna pa je 16S rRNK sekvenca *Mycoplasma heamofelis*, ki se od izbrane sekvence skupine A razlikuje kar za 39 odstotkov. Zanotraj same Skupine A so bile podobnosti 16S rRNK sekvenc med 81 do 100 odstotkov s povprečno vrednostjo 88 odstotkov, iz česar bi lahko sklepali, da Skupina A najverjetneje predstavlja takson nad nivojem vrste. Matrika distanc za molikute Skupine A je prikazana v Prilogi G.



**Slika 3:** Filogenetsko drevo izdelano metodo združevanja sosedov (ang.: Neighbour joining; programski paket MEGA). Ponovljivost vozlišč v drevesu smo ocenili z bootstrap metodo ponovnega vzorčenja pri 1000 ponovitvah. Pri sekvenkah, ki se uvrščajo v neuvrščene firmikute, je za imenom (številko) sekvence pripisan tudi njihov izvor. Poddrevo za 'Skupino A' je prikazano na naslednji sliki, ostala poddrevesa so prikazana v Prilogah B, C, D, E, F. Poddrevo (veja) *Acholeplasma/Anaeroplasma* vsebuje 11 sekvenč, poddrevo '*Candidatus Bacilloplasma*' 6 sekvenč, poddrevo '*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*' 3 sekvenč in poddrevo Termitska skupina 8 sekvenč. Seznam vse uporabljenih sekvenč se nahaja v Prilogah A1, A2 in A3.



**Slika 4:** Poddrevo 'Skupina A' prikazuje 16S rRNK sekvence in njihov izvor. Te sekvence smo v programu PRIMROSE uporabili kot tarčne sekvence za izdelavo začetnih oligonukleotidov. 16S rRNK sekvence označene s črno piko, so tiste, na osnovi katerih je program izdelal možne začetne oligonukleotide in so jih pri opisu skupine A uporabil Leser in sod. (2002).



**Slika 5:** Filogenetsko drevo 16S rDNK sekvenč, ki smo jih uporabili za izračun DNK distanc

**Preglednica 7:** Prikaz DNK distanc med izbranimi 16S rDNK sekvenčami

|       | ( 1 )           | ( 2 ) | ( 3 ) | ( 4 ) | ( 5 ) | ( 6 ) | ( 7 ) | ( 8 ) | ( 9 ) | (10) | (11) | (12) | (13) |
|-------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
| ( 1 ) | <b>AB089056</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 2 ) | <b>AF073454</b> | 0.21  |       |       |       |       |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 3 ) | <b>AY539724</b> | 0.29  | 0.27  |       |       |       |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 4 ) | <b>AJ419905</b> | 0.32  | 0.30  | 0.30  |       |       |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 5 ) | <b>AJ002268</b> | 0.28  | 0.31  | 0.26  | 0.14  |       |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 6 ) | <b>DQ157157</b> | 0.30  | 0.30  | 0.35  | 0.38  | 0.38  |       |       |       |      |      |      |      |
| ( 7 ) | <b>AY187288</b> | 0.32  | 0.26  | 0.23  | 0.25  | 0.22  | 0.34  |       |       |      |      |      |      |
| ( 8 ) | <b>X63781</b>   | 0.32  | 0.23  | 0.21  | 0.27  | 0.24  | 0.35  | 0.11  |       |      |      |      |      |
| ( 9 ) | <b>AY984785</b> | 0.34  | 0.31  | 0.25  | 0.30  | 0.32  | 0.41  | 0.24  | 0.23  |      |      |      |      |
| (10)  | <b>AF395313</b> | 0.38  | 0.35  | 0.31  | 0.30  | 0.30  | 0.46  | 0.26  | 0.27  | 0.29 |      |      |      |
| (11)  | <b>AF001742</b> | 0.33  | 0.29  | 0.30  | 0.29  | 0.29  | 0.39  | 0.25  | 0.25  | 0.29 | 0.32 |      |      |
| (12)  | <b>M23933</b>   | 0.32  | 0.26  | 0.28  | 0.27  | 0.24  | 0.39  | 0.22  | 0.22  | 0.24 | 0.28 | 0.23 |      |
| (13)  | <b>M23934</b>   | 0.33  | 0.30  | 0.27  | 0.26  | 0.27  | 0.37  | 0.24  | 0.25  | 0.25 | 0.30 | 0.25 | 0.19 |

Sivo zasenčeno polje označuje DNK distance med predstavnikom Skupine A (AF001742) in ostalimi sekvenčami

#### **4.2.2 Izdelava začetnih oligonukleotidov**

Za izdelavo specifičnih začetnih oligonukleotidov smo uporabili program PRIMROSE, verzijo 2.17 (D.E.Ashelford, 1991). Za tarčne sekvence smo uporabili vse sekvence, ki so se uvrščale v skupino A, začetne oligonukleotide pa smo izdelali na osnovi trinajstih sekvenc iz skupine A, pridobljenih iz vampa (Tajima, 1999), prebavila prašiča (Leser in sod., 2002) in črevesa človeka (Suau in sod., 1999). Celoten nabor sekvenc za izdelavo začetnih oligonukleotidov je prikazan na slik 3 in 4 ter v Prilogi A.

| 4.3 PREVERJANJE   | SPECIFIČNOSTI | IZBRANIH | ZAČETNIH |
|-------------------|---------------|----------|----------|
| OLIGONUKLEIOTIDOV |               |          |          |

S programom PRIMROSE smo odkrili 12 možnih začetnih oligonukleotidov (podatki niso prikazani), ki so prilegali na vse tarčne sekvence. Za bolj natančno preverjanje njihove specifičnosti smo uporabili spletno orodje ProbeMatch, ki omogoča tudi preverjanje specifičnosti ob dovoljeni eni, dveh ali treh napakah v parjenju med začetnim oligonukleotidom in tarčno sekvenco. Analize so pokazale, da se specifičnost vseh izbranih začetnih oligonukleotidov že ob dovoljeni eni ali dveh napakah pri naleganju močno poslabša, zato smo poskusili specifičnost izboljšati s kombinacijo dveh delno specifičnih začetnih oligonukleotidov. Zato smo preverili kombinacije vseh dvanajstih potencialnih oligonukleotidov in izbrali par, ki je združeval dve lastnosti, čimvečjo specifiko za določanje molikutov Skupine A in dolžino nastalih PCR pomnožkov vsaj 800 nt. Izbira dolžine vsaj 800 nt je ustrezna s filogenetskega stališča, saj so ob potencialnem kloniraju in sekvenciranju tako dolgi fragmenti genov za 16S rRNA primerni za dokaj dosledno filogenetsko umestitev. Ker z izdelavo primernih začetnih oligonukleotidov nismo uspeli doseči željene specifičnosti, smo se odločili, da težavo poskusimo zaobiti z izbiro točno določene restrikcijske endonukleaze.

Izbrani par začetnih oligonukleotidov (MolA 352f in MolA 1224r) so po naših navodilih sintetizirali v podjetju MWG – BIOTECH AG (Ebersberg, Nemčija)

Specifičnost izbranih začetnih oligonukleotidov (MolA 352f in MolA 1224r) smo preverjali z orodjem 'Probe Match' na spletni strani baze podatkov 'Ribosomal Database

Project II'. V analizo smo zaradi pričakovane velikosti PCR pomnožkov približno 880 nt, vključili vse v bazi shranjene sekvene (307898), torej tudi tiste, krajše od 1200 nt. Podatki veljajo za dan 1.4.2007.

**Preglednica 8:** Rezultati in silico analize primernosti začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r za določanje molikutov 'Skupine A'.

| Začetni oligonukleotid  | Zadetki brez napake |                    |                      | Zadetki z eno napako |                    |                      | Zadetki z dvema napakama |                    |                      |
|-------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|
|                         | Vsi zadetki         | Specifični zadetki | Nespecifični zadetki | Vsi zadetki          | Specifični zadetki | Nespecifični zadetki | Vsi zadetki              | Specifični zadetki | Nespecifični zadetki |
|                         | 269                 | 169                | 100                  | 31614                | 170                | 31445                | 164666                   | 170                | 164496               |
| MolA 352f               |                     |                    |                      |                      |                    |                      |                          |                    |                      |
| MolA 1224r              | 214                 | 164                | 50                   | 586                  | 170                | 422                  | 105457                   | 170                | 105287               |
| MolA 352f in MolA 1224r | 160 <sup>b</sup>    | 160                | 0                    | 203 <sup>c</sup>     | 170                | 33                   | 21135 <sup>d</sup>       | 170                | 20965                |

a - kombinacija obeh začetnih oligonukleotidov, za določitev preseka oznak (imen) za 16S rDNK sekvene smo uporabili orodje VLOOKUP iz programa Excel

b - presek oznak (imen) za 16S rDNK sekvene pri pravilnem naleganju obeh začetnih oligonukleotidov

c - presek oznak (imen) za 16S rDNK sekvene pri dovoljeni eni napaki pri naleganju vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov, torej največ dve napaki pri naleganju obeh

d - presek oznak (imen) za 16S rDNK sekvene pri dovoljenih dveh napakah pri naleganju vsakega od obeh začetnih oligonukleotidov, torej največ štiri napake pri naleganju obeh

Preglednica 5 prikazuje rezultate *in silico* analize specifičnosti začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r. Specifika vsakega posameznega začetnega oligonukleotida je ustrezna le v primeru pravilnega naleganja. MolA 352f, ki je manj specifičen od obeh, naleže ob dovoljeni eni napaki na vse tarčne sekvene skupine A (ki jih je 170) in še na 31445 netarčnih sekven, ob dovoljenih dveh napakah pa je popolnoma nespecifičen. Specifika MolA 1224r je sicer malce boljša, tako da ob dovoljeni eni napaki naleže na sekvene skupine A in še na približno dvakrat toliko netarčnih sekven, ob doveljenih dveh napakah pa je približno tako (ne)specifičen kot MolA 352f.

*In silico* analize so pokazale, da lahko s kombinacijo obeh začetnih oligonukleotidov specifičnost znatno izboljšamo. Presek sekven, ki jih najdetra oba začetna oligonukleotida,

smo izračunali v programu Excel z orodjem VLOOKUP. Rezultati so pokazali, da je kombinacija začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r v primeru uporabe v verižni reakciji s polimerazo z najbolj strogimi pogoji pomnoževanja, ki bi omogočalo le naleganja začetnih oligonukleotidov brez napak, primerna za odkrivanje molikutov skupine A, saj zazna 160 tarčnih sekvenc, ne omogoča pa pomnoževanja drugih sekvenc. Ob dovoljeni eni napaki (pri vsakem začetnem oligonukleotidu) pri naleganju obeh začetnih oligonukleotidov se specifičnost sicer malce poslabša, pomnožilo bi se 170 tarčnih sekvenc in tudi 33 netarčnih sekvenc, ki sicer sodijo v širšo skupino molikutov, ne pa v Skupino A. To na naše delo verjetno ne bi imelo večjega vpliva, saj so analize pokazale, da teh 33 sekvenc izhaja iz popolnoma drugih ekosistemov (termalni vrelci, mokrišča, sedimenti, zemlja). Zaradi velikega števila nespecifičnih zadetkov pri dovoljenih dveh napakah pri naleganju vsakega posameznega začetnega oligonukleotida, je posledično veliko tudi število nespecifičnih zadetkov (20965) pri kombinaciji obeh začetnih oligonukleotidov. Teh sekvenc je preveč, da bi analizirali vsako posamezno, izhajajo pa praktično iz vseh glavnih debel kraljestva *Bacteria*.

Ker je pri analizi ustreznosti in specifičnosti začetnih oligonukleotidov smiselno vedeti, kje se pri manj strogih pogojih pomnoževanja napake pri naleganju le-teh nahajajo, smo za sekvence, ki jih najdeti oba začetna oligonukleotida z eno napako in tiste, ki jih najdeti oba z dvema napakama in se uvrščajo v neuvrščene firmikute, preverjali pozicijo napačnih parjenj znotraj tarčnega zaporedja (Priloga H). Na učinkovitost in natančnost verižne reakcije s polimerazo zaradi odsotnosti 3'→5' eksonukleazne aktivnosti pri *Taq* polimerazi, vplivajo predvsem napake na 3'- koncu, pa tudi samo podaljševanje v tem primeru poteka počasneje (Kwok in sod., 1994). Kot je razvidno iz Priloge H, prihaja pri obeh začetnih oligonukleotidih do napačnih parjen znotraj tarčnih odsekov in ne na koncih.

#### 4.4 LOČEVANJE SEKVENC MOLIKUTOV IZ 'SKUPINE A' OD OSTALIH MOLIKUTOV Z RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO *PaeI*

Zaradi nespecifičnosti začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r ob dovoljeni eni ali dveh napakah naleganja na tarčno sekvenco, smo skušali povečati specifičnost odkrivanja molikutov iz skupine A tudi v (teoretsko) bolj neoptimalnih razmerah

pomnoževanja. Zato smo tarčne sekvence ponovno pregledali ter pri tem iskali specifična restrikcijska mesta znotraj pomnoževanih delov sekvenc genov za 16S rRNK. V analizo smo poleg sekvenc molikutov Skupine A vključili tudi sekvence 16S rDNK, na katere sta začetna oligonukleotida nalegala ob dovoljeni eni ali dveh napakah ter sekvence 16S rDNK glavnih skupin molikutov. Ker je sekvenc, ki jih začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r zadaneta ob dovoljeni eni ali dveh napakah pri naleganju preveč, da bi vse pregledali, smo pri iskanju specifičnih restrikcijskih mest v analizo vključili le sekvence, ki se uvrščajo v neuvrščene firmikute. Te sekvence namreč izhajajo iz istih (prebavnih) ekosistemov, kot tarčne sekvence skupine A.

*In silico* analiza je pokazala, da je prepoznavno mesto restrikcijske endonukleaze *PaeI* (GCATG↓C) prisotno v vseh sekvenah molikutov iz Skupine A. V preglednici 9 je prikazana ohranjenost restrikcijskega mesta endonukleaze *PaeI* pri sekvenah molikutov iz Skupine A in njena uporabnost pri razlikovanju od drugih sekvenc. Ugotovili smo, da je restrikcijsko mesto *PaeI* ohranjeno pri vseh tarčnih sekvenah iz Skupine A, medtem ko je na zadnjem mestu restrikcijskega mesta drugih molikutskih sekvenc vgrajen timin namesto citozina, kar seveda preprečuje specifični razrez z restrikcijsko endonukleazo *PaeI*.

**Preglednica 9 :** Preglednica prikazuje naleganje začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r na tarčne sekvence in uporabnost restriktaze PaeI pri razlikovanju skupine A od ostalih molikutov in neklasificiranih firmikutov.

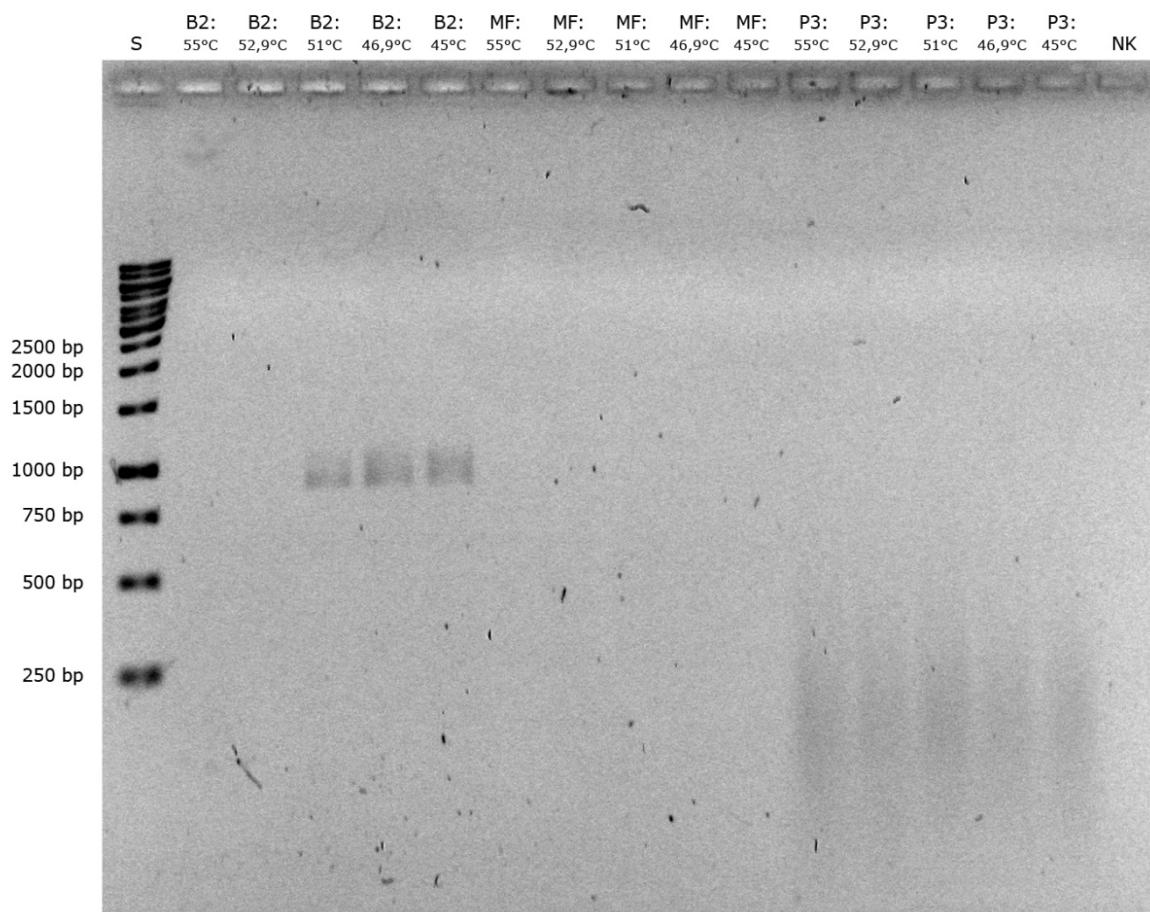
|                                   | MolA 352f |     |     |     |     |     | PaeI (SphI) |     |     | MolA 1224r <sup>a</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|                                   | C         | AGC | AGT | TAG | GAA | TA  | GCA         | TGC | TG  | GC                      | TAC | AGG | CGT | GCT | ATA | ATG | GC  |     |     |     |    |
| <b>Skupina A</b>                  |           |     |     |     |     |     |             |     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| AF371522                          | GA        | GAC | AGC | AGT | TAG | GAA | TAT         | TCG |     | GA                      | GCA | TGC | TG  | GC  | TAC | AGG | CGT | GCT | ATA | ATG | GC |
| AF371523                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .  |
| AF371524                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .  |
| AF371525                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .  |
| AF371526                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | T.  | .   | .   | .   | .  |
| AF371527                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| AF371528                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| AF371529                          | .         | .   | G.  | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| AF001770                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .  |
| AF132233                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .  |
| AF132232                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| AF001741                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| AF001742                          | .         | .   | .   | .   | .   | .   | .           | .   | .   | .                       | C.  | .   | .   | A.  | .   | .   | .   | .   | C.  | .   | .  |
| <b>Neklasificirani Firmicutes</b> |           |     |     |     |     |     |             |     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| AY979071                          | .         | .   | G.  | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AB185576                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AY990021                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AB239486                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| DQ394701                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| DQ803192                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AJ811983                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| EF096344                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| DQ441359                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AB270122                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| DQ673542                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AY992621                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AF132245                          | .         | G.  | .   | .   | .   | GG. | .           | .   | .GC | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| <b>Nekateri Mollicutes</b>        |           |     |     |     |     |     |             |     |     |                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| AF001736                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | .   | AA  | .   | .   | C. |
| AJ311394                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | .   | AA  | .   | .   | A. |
| AJ964959                          | .         | G.  | .   | .   | .   | A.  | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | .   | AA  | .   | .   | C. |
| AF371513                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AY984785                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | A  |
| X63781                            | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | T  |
| AF202925                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| AJ002268                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | C.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | T  |
| AJ419905                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | C.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | A  |
| AY500249                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | G.  | .   | .   | .   | CA  | .   | .   | C. |
| DQ157157                          | .         | AG. | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | C.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | G.  | AA  | .   | .   | C. |
| AB192228                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | AA  | .   | .   | C.  | T  |
| AF073454                          | .         | G.  | .   | .   | .   | AG. | .           | .   | T.  | .                       | .   | .   | T   | .   | .   | .   | G.  | AA  | .   | .   | C. |

a – reverzni komplement začetnega oligonukleotida MolA1224r

Po razrezu približno 900 nt dolgih PCR pomnožkov genov za 16S rRNK molikutov iz 'Skupine A' z restrikcijsko endonukleazo *PaeI*, smo pričakovali dva restrikcijska fragmenta, dolga približno 300 in 600 nt.

#### 4.5 UGOTAVLJANJE NAJBOLJ PRIMERNE TEMPERATURE NALEGANJA ZA ZAČETNA OLIGONUKLEOTIDA MolA 352f IN MolA 1224r

Pri PCR reakcijah je, kadar poskušamo zagotoviti primerno specifičnost reakcije, kritična predvsem temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov. Za njeno določitev smo uporabili gradientno verižno reakcijo s polimerazo, v kateri smo serijo identičnih reakcijskih mešanic pomnoževali tako, da je potekalo naleganje začetnih oligonukleotidov vsake posamezne reakcije pri rahlo povečani temperaturi in sicer v območju od 45 °C do 55 °C. Reakcijo smo izvedli na treh vzorcih skupne mikrobne DNK, in sicer iz vampa (B2), človeškega (MF) in prašičjega (P3) blata. Le te smo izbrali zaradi predhodnih raziskav (Tajima, 1999; Leser in sod., 2002; Suau in sod., 1999), ki so pokazale, da so molikuti 'Skupine A' v teh ekosistemih prisotni.

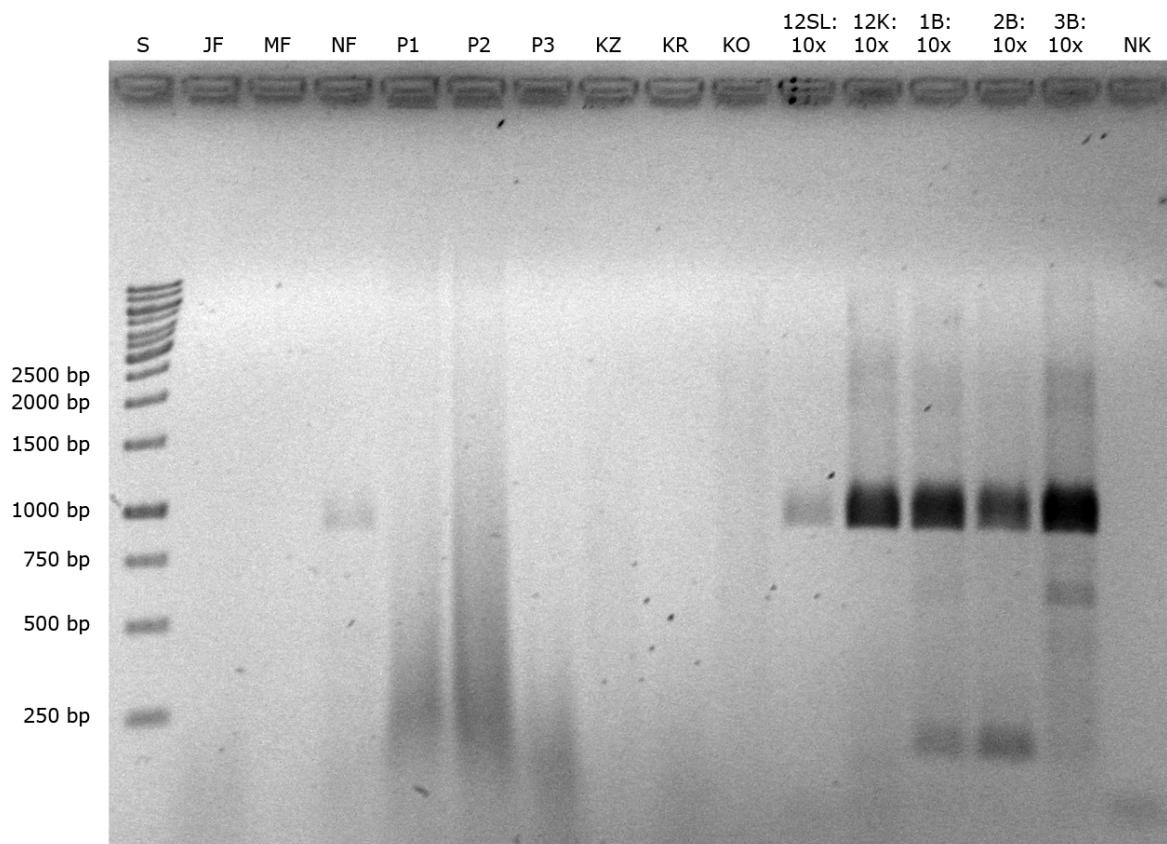


**Slika 6:** Na 1 % agarozni gel nanešeni produkti PCR reakcije z gradientno temperaturo iz vzorcev govejega vampa (B2), človeškega (MF) in prašičjega blata (P3). Uporabljena začetna oligonukleotida specifična za 'Skupino A'. Poleg oznak vzorcev so prikazane tudi temperature, pri katerih je potekala verižna reakcija s polimerazo. S je velikostni standard 1kB 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Na gel smo nanesli 5 µl PCR produktov.

Rezultati so prikazani na sliki 4. Pomnožke PCR smo opazili pri vzorcu iz vampa (B2), in sicer pri temperaturah 51 °C, 46,9 °C in 45 °C. Lise, vidne na agaroznem gelu, so pri vseh treh temperaturah razmazane, kar kaže na nastanek nespecifičnih PCR produktov. Nastanek nespecifičnih produktov je pri tako nizkih temperaturah naleganja pogost. Pri vzorcih prašičjega blata (P3) in človeškega blata (MF) do pomnoževanja tarčnih odsekov genov za 16S rRNA ni prišlo, čeprav bi glede na podatke iz strokovnih člankov in *in silico* analize to pričakovali.

Za temperaturo prileganja smo izbrali vmesno vrednost ( $47^{\circ}\text{C}$ ) med prej navedenimi temperaturami.

#### 4.6 SPECIFIČNO POMNOŽEVANJE DELOV GENOV ZA 16S rRNK MOLIKUTOV IZ 'SKUPINE A' Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO



**Slika 7:** Na 1 % agarozni gel naneseni PCR pomnožki 16S rDNK iz vzorcev človeškega (JF, NF, MF), prašičjega (P1, P2, P3), kozjega (KZ), kravjega (KR) in konjskega blata (KO), iz slepega (12SL) in debelega črevesa kunca (12K) ter iz govejega vampa (B1, B2, B3). Uporabljena za skupino A specifična začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r. S je velikostni standard 1kB 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitve vzorcev osamljenih skupne DNK. Na gel smo nanesli 20  $\mu\text{l}$ , oziroma celotne PCR reakcijske mešanice.

Pomnožke genov za 16S rRNK ustrezne velikosti smo odkrili pri vseh treh vzorcih iz kravjega vampa (B1, B2, B3), enem od treh vzorcev človeškega blata (NF), in tako iz slepega (12SL) kot tudi debelega črevesa (12K) kunca, oziroma pri 43 odstotkih vseh pregledenih vzorcev. Glede na *in silico* analize in podatke pridobljene iz strokovnih

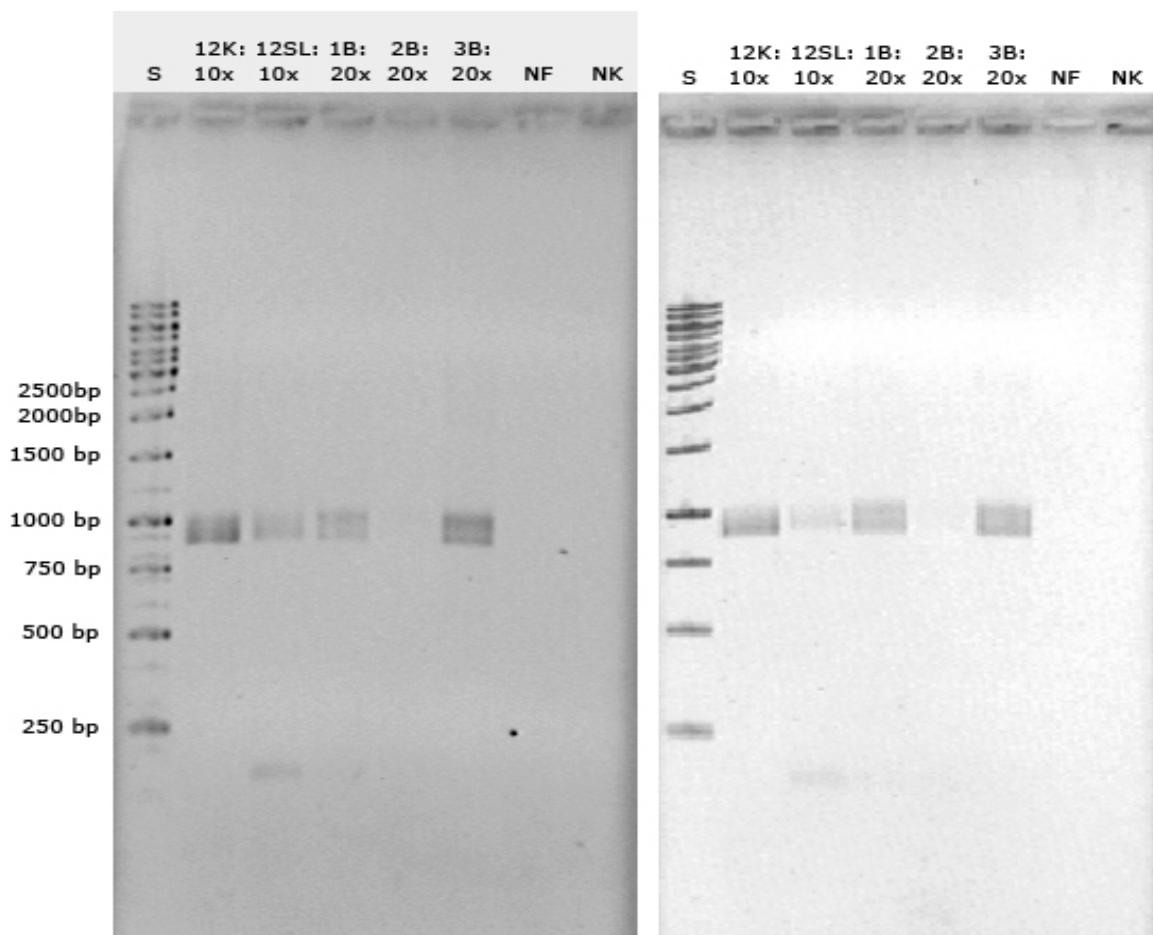
člankov, bi pričakovali pozitiven rezultat tudi pri vzorcih blata preostalih dveh ljudi (MF, JF), pri vzorcih prašičjega (P1, P2, P3) in tudi konjskega blata (KO).

Po elektroforetski ločitvi PCR pomnožkov v 1 % agaroznem gelu, so bile vse lise neostre, kar je najverjetneje povezano z nizko temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov pri verižni reakciji s polimerazo, katere posledica je lahko nastajanje nespecifičnih produktov. Le delno bi lahko bila za razmazane lise kriva tudi razlike znotraj same 'Skupine A', saj so *in silico* analize pokazale, da velikost PCR produktov variira od najnižje velikosti 871 nt do največ 888 nt.

#### 4.7 RAZREZ POMNOŽKOV 16S rDNK MOLIKUTOV IZ 'SKUPINE A' Z RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO *PaeI*

Za restrikcijo smo najprej pripravili povečane reakcije PCR z volumnom 100 µl. Po PCR reakciji smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili uspešnost pomnoževanja (Slika 6, levo)

PCR pomnožke ustrezne velikosti smo odkrili pri vzorcih iz debelega (12K) in slepega črevesa kunca (12SL) ter pri dveh vzorcih iz vampa (1B in 3B). Pozitivni rezultat smo pričakovali tudi pri tretjem vzorcu iz vampa (B2), saj smo tako pri določanju temperature naleganja z verižno reakcijo s polimerazo s temperaturnim gradientom (Slika 6), kot tudi pri sledeči PCR reakciji (Slika 7), pri tem vzorcu dobili pozitiven rezultat. Pričakovanega pozitivnega rezultata nismo dobili tudi pri vzorcu človeškega blata (NF). Ker smo tudi pri prejšnji PCR reakciji pri tem vzorcu v primerjavi z ostalimi dobili relativno malo produkta, je verjetno, da je bila koncentracija tarčnih nukleinskih kislin prenizka, oziroma jih v 1 µl mikrobne DNK, ki smo ga dodali v PCR mešanico ni bilo.

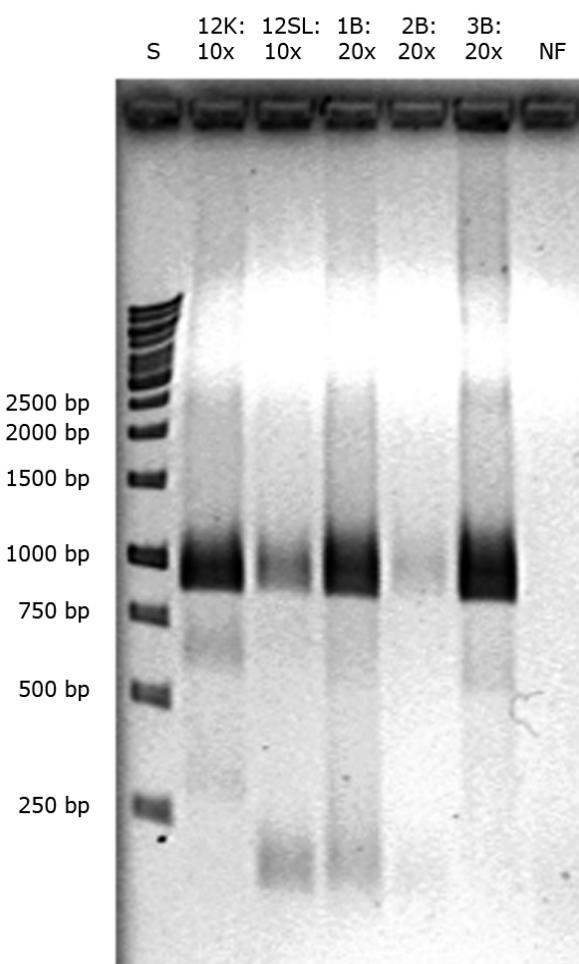


**Slika 8:** Na 1 % agarozni gel nanešeni produkti preparativne (100 µl) PCR reakcije z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r pred (levo) in po čiščenju (desno) s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit. S je velikostni standard 1kb 'O'Gene Ruler™ 1kb Ladder (Fermentas). Na gel smo nanesli 5µl vsakega PCR produkta iz vzorcev čoveškega blata (NF), slepega (SL12) in debelega črevesa kunca (12K) ter iz govejega vampa (1B, 2B, 3B). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitve osamljenih nukleinskih kislin.

Po pomnoževanju odsekov genov za 16S rRNK molikuov iz Skupine A in preverjanju uspešnosti pomnoževanja z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 8, levo), smo PCR produkte očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit. Čiščenje PCR produktov je pred restrikcijo priporočljivo predvsem v primeru, ko sledi postopek koncentracije DNK, pri katerem se skoncentrirajo tudi soli, ki lahko vplivajo na delovanje restrikcijske endonukleaze. Med čiščenjem se običajno del DNK izgubi, zato smo po čiščenju z agarozno gelsko elektroforezo ponovno preverili prisotnost PCR produktov (Slika 8, desno). Pred samo restrikcijo smo prečiščene PCR produkte pri 45 °C

skoncentrirali v vakumski centrifugi za koncentracijo vzorcev (Eppendorf Concentrator 5301).

Po restrikciji smo predvidevali tri možne rezultate. Če restrikcijska endonukleaza ne reže PCR pomnožkov (ena lisa, ki ustreza velikosti približno 900 nt), lahko sklepamo, da z verižno reakcijo s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r nismo uspeli pomnožiti tarčnih sekvenc genov za 16S rRNK iz molikutske 'skupine A'. Ob morebitnih treh lisah, ki ustrezano velikostim približno 900 nt, 300nt in 600 nt, lahko sklepamo, da je del PCR pomnožkov, ki ga je restrikcijska endonukleaza razrezala, najverjetnej iz 'skupine A', nerezani PCR produkti pa so posledica nastajanja nespecifičnih produktov. V primeru dveh lis, ki ustreza velikostim 300 nt in 600 nt, lahko sklepamo, da so vsi PCR pomnožki verjetno nastali iz DNK molikutov iz Skupine A.



**Slika 9:** Na 1 % agarozni gel naneseni (približno 9-krat skoncentrirani) PCR pomnožki 16S rDNK vzorcev 12K (debelo črevo kunca), 12SL (slepo črevo kunca), 1B, 2B, 3B (goveji vamp) in NF (človeško blato) po restrikciji z *PaeI*. Na gel smo nenesli celotno restrikcijsko mešanico (20 µl). Pri verižni reakciji s polimerazo porabljena za skupino A specifična začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r. S je velikostni standard 1kB 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitve vzorcev osamljene skupne DNK.

Iz slike 9 je razvidno, da je restrikcija uspela samo pri vzorcu iz slepega črevesa kunca (12K). Pri vzorcih iz vampa 3B in B1 (vamp) je sicer vidna lisa, ki ustreza velikosti 600 nt, vendar pa lise v velikosti 300 nt ne vidimo. Tega rezultata ne moremo vzeti kot pozitivnega, saj je možno, da je ta lisa posledica nespecifičnih pomnožkov, ki jih v prejšnjih PCR reakcijah zaradi premajhne količnine PCR pomnožkov (pripravljali smo reakcijske mešanice volumna 20 µl) nismo zaznali. Iz slike je razvidno tudi, da se je predvidevanje o premajhni količini PCR pomnožka pri vzorcu človeškega blata (NF) izkazalo za pravilno. Po nanosu 4-krat večje količine PCR produktov je lisa še vedno slabu

vidna. Lise so v vseh primerih razmazane, kar je lahko posledica nastajanja nespecifičnih produktov tekom verižne reakcije s polimerazo. Delno je za razmaz kriva tudi računalniška obdelava slike, saj je bilo potrebno za izboljšano vizualizacijo močno povečati kontraste na sliki.

## 5. RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Molikuti 'Skupine A'

Zaradi vse pogostejše uporabe metod direktnega pridobivanja in analize tarčnih genov, predvsem za 16S rRNK, je v zadnjem desetletju postala možna tako ocena genetske raznolikosti, kot tudi filogenetskih odnosov med mikroorganizmi v različnih ekosistemih, brez zamudnega in velikokrat neuspešnega gojenja (Tajima, 1999). Izsledki tovrstnih raziskav so med drugim pokazali tudi, da so v prebavnih traktih prašičev, ljudi in v vampu goveda prisotne sekvence 16S rDNK skupine bakterij, ki se najverjetneje uvrščajo v novo, še nepoznano skupino znotraj redu *Mollicutes*, poimenovano 'Skupina A'. Leser in sodelavci (2002) so tako 8 filotipov iz prašičjega prebavnega trakta, 4 filotipe iz vampa goveda (Tajima in sod., 1999) in 2 filotipa iz človeškega blata (Suau in sod., 1999) uvrstili v evolucijsko staro vejo znotraj molikutov, umeščeno blizu rodov *Mycoplasma* in *Spiroplasma* (2002). V tem delu smo poleg prej omenjenih filotipov v raziskave vključili tudi sekvence iz prebavil kokoši (Lu in sod., 2003; Bjerrum in sod., 2006), goril (Frey in sod., 2006), termitov (Hongoh in sod., 2006), konjev (Simpson in sod., 2004), podgan (Brooks in sod., 2003) in dodatne sekvence iz prebavil ljudi (Gill in sod., 2006; Eckburg in sod., 2005; Ley, 2005; Ozutsumi in sod., 2005) iz RDP gruče neklasificiranih molikutov in firmikutov, ki so se glede na naše primerjave uvrščale v 'Skupino A'. Samo uvrščanje 'Skupine A' znotraj razreda *Mollicutes* se pri različnih avtorjih sicer razlikuje, vendar pa se isti filotipi vedno uvrščajo v to skupino. Podobnost med sekvencami znotraj 'Skupine A' glede na naše rezultate (Priloga G) variira od 81 do 100-odstotkov s povprečno vrednostjo 88-odstotkov (vključenih 40 sekvenc 16S rDNK), kar je nekoliko večja podobnost, kot so jo izračunali Leser in sodelavci (75,5 do 96,4 %). Podobnosti med 16S rDNK sekvencami nakazujejo, da 'Skupina A' najverjetneje predstavlja nov takson, ki sodi nad nivo vrste.

Skupno vsem mikroorganizmom, katerih sekvence 16S rDNK smo v tem diplomskem delu uporabili, je kolonizacija prebavnega sistema (večinoma črevesja), predvsem vretenčarjev. O sami funkciji, lastnostih in delovanju te skupine mikroorganizmov seveda na osnovi

analize sekvenc male ribosomske podenote ne moremo sklepati, skušali pa smo poiskati metodo, s katero bi čim bolj zanesljivo potrdili prisotnost 'Skupine A' v prebavilih različnih živali.

### 5.1.2 Iskanje ustrezne metode za določanje molikutov 'Skupine A'

Iskanje molikutov 'Skupine A' se je pokazalo za težavno že na samem začetku dela. Sprva smo namreč žeeli njihove sekvene 16S rDNK pomnoževati s parom začetnih oligonukleotidov MGSO-e1 in GPO-1e (Kong in sod., 2001), ki naj bi bila ustrezna za pomnoževanje ribosomskih genov vseh oziroma velikega števila molikutov. Ker z verižno reakcijo s polimerazo pri nobenem od vzorcev nismo dobili pozitivnega rezultata, smo sklenili preveriti ustreznost začetnih oligonukleotidov pri iskanju sekvenc 16S rDNK 'Skupine A'. *In silico* analize so pokazale, da s tem parom začetnih oligonukleotidov želenih sekvenc ne moremo pomnožiti. Zato smo sprva skušali modificirati MGSO-e1 in/ali GPO-1e, a se je specifičnost obeh ob vsaki prilagoditvi na sekvene 'Skupine A', močno poslabšala. Zato smo se odločili, da poskusimo začetne oligonukleotide določiti sami (jih naročiti/kupiti) in nato uporabiti v PCR reakcijah.

Za izdelavo začetih oligonukleotidov smo izbrali program PRIMROSE, ki na podlagi izbranih tarčnih sekvenc izdela take začetne oligonukleotide, ki najdejo čimveč tarčnih sekvenc in prilegajo na čim manj drugih sekvenc. Čeprav je program predlagal 12 možnih začetnih oligonukleotidov, je preverjanje ustreznosti le-teh s spletnim orodje ProbeMatch pokazalo, da se specifičnost ob dovoljeni eni ali dveh napakah v večini primerov močno poslabša. Večina (8) možnih začetnih oligonukleotidov je vsebovalo tudi vsaj eno ali več degeneriranih mest, ki še povečajo možnost napačnega prileganja na DNK.

Ker z izdelavo primernih začetnih oligonukleotidov nismo uspeli doseči željene specifičnosti, smo se odločili, da jo poskusimo povečati s kombinacijo dveh delno specifičnih začetnih oligonukleotidov. Zato smo preverili kombinacije vseh dvanajstih možnih začetnih oligonukleotidov in izbrali par, ki je združeval dve lastnosti, čimvečjo specifičnost in dolžino nastalih PCR pomnožkov vsaj 800 nt. Izbira dolžine vsaj 800 nt je ustrezna s filogenetskega stališča, saj so ob potencialnem kloniranju in sekvenciranju tako

dolgi odseki genov za 16S rRNK primerni za dokaj zanesljivo filogenetsko umestitev. Ker tudi s kombinacijo dveh delno specifičnih začetnih oligonukleotidov nismo dosegli željene specifičnosti, smo poskušali izbrati takšno restriktivno endonukleazo, ki nam bo omogočila razločevanje med specifično in nespecifično nastalimi PCR produkti.

Pri izbiri ustreznih restriktivnih endonukleaze smo si pomagali s spletnim orodjem NEBcutter V2.0. Utreznost izbrane restriktivne endonukleaze *PaeI* smo preverili na izpisu vseh nukleotidnih sekvenč 16S rDNK, ki sodijo v 'Skupino A'. Kot nekakšno »negativno« kontrolo smo uporabili vse sekvenče, na katere oba začetna oligonukleotida (MolA 352f in MolA 1224r) prilegata ob dovoljeni eni napaki (podatki niso prikazani), sekvenče neuvrščenih firmikutov na katere začetna oligonukleotida prilegata ob morebitnih dveh napakah (in naseljujejo iste ekosisteme), ter sekvenče predstavnikov glavnih skupin molikutov. Glede na sekvenče, ki smo jih pregledali, bi lahko dejali, da je izbira restriktivne endonukleaze ustreznih, saj omogoča razlikovanje med specifično in nespecifično nastalimi PCR produkti.

### **5.1.3 Pomnoževanje delov genov 16S rRNK 'Skupine A' z verižno reakcijo s polimerazo**

Z začetnima oligonukleoidoma F968-GC in 1401R (Nübel in sod., 1996) smo uspešno pomnožili dele genov za 16S rRNK pri vseh vzorcih in s tem potrdili prisotnost bakterijske DNK.

Začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r so sintetizirali po naših navodilih, zato je bilo potrebno najprej z verižno reakcijo s polimerazo v temperaturnem gradientu pri enem vzorcu DNK, osamljene iz kravjega vampa, določiti temperaturo prileganja. Že zelo nizka temperatura naleganja ( $47^{\circ}\text{C}$ ) nam je dala sluttiti, da bo pomnoževanje odsekov genov za 16S rRNK težavno.

Glede na *in silico* analize in podatke iz strokovnih člankov smo pričakovali pozitiven rezultat vsaj pri trinajstih vzorcih, produkte PCR reakcije z začetnima oligonukleoidoma MolA 352f in MolA 1224r pa smo odkrili le pri šestih od petnajstih vzorcev. Pri vseh uspelih PCR reakcijah so vedno nastajali nespecifični PCR produkti, kar je lepo vidno iz

razmazanih oz. skoraj dvojnih lis na Slikah 6, 7 in 8 . Pri vzorcu iz vampa (B3) je poleg pričakovane velikosti PCR produkta (približno 900 nt) nastala tudi dokaj velika količina nespecifičnega PCR produkta velikosti približno 600 nt. Razlogov za neuspešno, oziroma nespecifično pomnoževanje odsekov genov za 16S rRNK molikutske 'Skupine A' je lahko več. Najprej je potrebno izpostaviti zelo nizko temperaturo prileganja. Za specifično prileganje začetnih oligonukleotidov se priporoča temperatura višja od 55 °C, mi pa smo PCR produkte dobili pri temperaturi 47 °C. Možen vzrok za nastajanje nespecifičnih PCR produktov je tudi dvakratna degeneriranost začetnega oligonukleotida MolA 1224r. Potrebno je seveda poudariti, da so tudi *in silico* analize specifičnosti vsakega posameznega začetnega oligonukleotida in kombinacije obeh, pokazale, da je specifičnost pogojno zadostna ob največ eni napaki pri prileganju. Nespecifični PCR produkti so lahko tudi posledice velikega števila ciklov (35). Pogostost pojavljanje himernih sekvenc se namreč s številom ciklov povečuje. Po tridesetih ciklih lahko himerne sekvene predstavljajo tudi do 32 % vsega pomnožka (Wang in Wang, 1996; Leser in sod., 2002).

Specifičnost PCR narašča z višanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in z nižanjem koncentracije MgCl<sub>2</sub>. Ker temperature prileganja ne moremo spremenjati, bi lahko poskusili PCR protokol optimizirati s spremnjanjem koncentracije MgCl<sub>2</sub>.

Razlogov za neuspešno pomnoževanje odsekov genov za 16S rRNK molikutov 'Skupine A' pri devetih vzorcih je lahko več. Pogost problem pri pomnoževanju s polimerazo iz nukleinskih kislin, osamljenih iz okoljskih vzorcev, predstavlja prisotnost snovi, ki inhibirajo delovanje *Taq* polimerazo. Možen razlog je lahko tudi slaba kvaliteta osamljene skupne DNK, ki je posledica nenehnega odtajevanja in zmrzovanja ali kontaminacije z restrikcijskimi endonukleazami. Seveda obstaja tudi možnost, da tarčnih nukleinskih kislin v vzorcih sploh ni bilo, oziroma so bile prisotne v premajhnih količinah, da bi jih s verižno reakcijo s polimerazo lahko zaznali.

Pri verižni reakciji s polimerazo je nujna oz. priporočljiva tudi uporaba negativne in pozitivne kontrole pomnoževanja, saj z uporabo le-teh izključimo lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. Pri našem delu nismo imeli možnosti uporabe pozitivne kontrole, saj so molikuti skupine A poznani le po zaporedju genov 16S rRNK, začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA1224r pa sta zasnovana tako, da ne omogočata pomnoževanja *in vitro*

gojenih molikutov, ki bi jih bilo možno dobiti in njihovo DNK uporabiti kot pozitivno kontrolo.

#### **5.1.4 Restrikcija PCR pomnožkov z restriksijsko endonukleazo *PaeI***

Razrez z restriksijsko endonukleazo *PaeI* je uspel samo pri vzorcu iz debelega črevesa kunca, pri katerem smo dobili pričakovane lise v velikosti približno 300 in 600 nt. Ker je bil po restrikciji viden tudi nerazrezan PCR produkt v velikosti približno 900 nt, lahko predvidevamo, da je med verižno reakcijo s polimerazo nastalo tudi veliko nespecifičnega produkta. Na to kažejo tudi neostre lise pri vseh predhodnih PCR reakcijah, ko produktov nismo rezali.

Pri ostalih vzorcih, kjer do restrikcije ni prišlo, lahko sklepamo, da so vsebovali samo nespecifične PCR produkte, ker izbira začetnih oligonukleotidov in pogojev reakcije ni zagotovila zadostne natančnosti pomnoževanja tarčnih 16S rRNA genov.

Izbira restriksijske endonukleaze *PaeI* se zdi glede na naše raziskave utemeljena, saj smo jo izbrali ravno zato, da bi olajšali odkrivanje 'Skupine A' in zmanjšali napake nastale zaradi napačnega prileganja začetnih oligonukleotidov.

#### **5.1.5 Nadaljnje raziskave**

Na osnovi uspele restrikcije pri enem samem vzorcu (debelo črevo kunca, 12K), seveda ne moremo sklepati, da smo uspeli pripraviti primeren postopek za iskanje 16S rRNA sekvenč 'Skupine A'. Za samo potrditev prisotnosti genov za 16S rRNA 'Skupine A' bi bilo potrebno še veliko dela. Najprej bi bilo potrebno optimalizirati sam PCR protokol (s spremenjanjem koncentracije MgCl<sub>2</sub>), da bi dobili manj nespecifičnih pomnožkov. PCR pomnožke bi bilo potrebno nato klonirati v ustrezni vektor in z njim transformirati kompetentne celice. Po selekciji klonov bi bilo potrebno osamiti DNK in nastaviti restrikcijo z restriksijsko endonukleazo *PaeI*. Vzorce, pri katerih bi prišlo do ustrezne restrikcije (predvidevamo, da so to sekvenči iz 'Skupine A'), bi bilo potrebno sekvencirati

in šele po analizi sekvenc, izločanju potencialnih himernih sekvenc in filogenetski umestitvi, bi lahko vedeli, ali sekvence dejansko izhajajo iz 'Skupine A'.

Tudi pri izbiri vzorcev bi lahko naredili določene spremembe. Sicer je večina sekvenc 16S rDNK, ki se uvrščajo v 'Skupino A', glede na prejšnje raziskave izhajalo iz vzorcev blata, nekatere sekvence pa so pridobili tudi iz biopsij različnih predelov stene debelega črevesa, zato bi bilo potrebno preveriti tudi tovrstne vzorce. V splošnem se vzorci blata, ki jih je najlažje pridobiti, prevečkrat uporabljajo kot nadomestek za celotno mikrobioto prebavnega trakta, ali tudi samo zadnjega dela le-tega. Mikrobiota blata je kombinacija odpadlih bakterij, ki so pritrjene na mukozno površino črevesja in nepritrjenih bakterij. Ker so pri molikutih tesne in specifične asociacije z gostiteljem (gostiteljska in tkivna specifika) pogoste, ne moremo izključiti možnosti, da so predstavniki Skupine A pritrjeni na površino epitela prebavil in jih v samem blatu ni dovolj, da bi jih z verižno reakcijo s polimerazo lahko zaznali.

## 5.2 SKLEPI

- Pomnožke sekvenc genov 16S rRNK molikutov 'Skupine A' smo odkrili pri vzorcih iz govejega vampa, slepega in debelega črevesa kunca ter človeškega blata. Ker je pri PCR reakcijah nastajalo veliko nespecifičnih produktov, ne moremo zagotovo trditi, da pomnožki izhajajo iz molikutov Skupine A.
- Izbira restrikcijske endonukleaze *PaeI* je glede na rezultate *in silico* analize primerna za razlikovanje pomnožkov delov sekvenc 16S rDNK molikutov Skupine A od nastalih nespecifičnih PCR produktov.
- Restrikcija z restrikcijsko endonukleazo je uspela samo pri vzorcu iz debelega črevesa kunca. Na gelu je vidna tudi velika količina nerazrezanega PCR produkta, kar potrjuje, da so med samo PCR reakcijo nastajali nespecifični produkti.
- Uspela PCR reakcija in restrikcija še ne potrjujeta, da so v vzorcih dejansko prisotni molikuti 'Skupine A'. Za nedvomno potrditev prisotnosti 'Skupine A' je potrebno določiti sekvence.
- Začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA1224r v kombinaciji z restrikcijsko endonukleazo *PaeI* nudijo ob nadaljnem delu osnovo za pripravo učinkovitega postopka za odkrivanje molikutov iz Skupine A.

## 6      POVZETEK

Gojenje bakterij iz redu *Mollicutes* v laboratorijskih razmerah je zaradi njihovih nenavadnih prehranskih zahtev pogosto neuspešno. Šele uporaba molekularno bioloških metod pri mikrobno ekoloških študijah je pokazala, da so molikuti v naravi zelo razširjeni. Tako so sekvene njihovih genov odkrili pri različih živalih, ljudeh in mnogih rastlinah. Pogost habitat molikutov je, kot kažejo raziskave, tudi prebavni sistem različnih živali. V prebavnem traktu kopenskega raka *Porcellio scaber* so odkrili kar dve novi kandidatni skupini, ki se uvrščata v razred *Mollicutes*, '*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*', ki naseljuje hepatopankres in '*Candidatus Bacilloplasma*', ki naseljuje papilatno regijo zadnjega prebavila. Molekularno ekološke raziskave mikrobnih združb v prebavilih ljudi, prašičev in goveda so pokazale tudi prisotnost ribosomskih sekvenč do sedaj še neznane skupine molikutov, ki so jo avtorji poimenovali Skupina A. Ribosomske sekvene te skupine so do sedaj odkrivali naključno, ob preiskovanju splošne strukture mikrobne združbe v teh ekosistemih. V našem delu smo poskusili pripraviti primerno molekularno biološko metodo za odkrivanje mikroorganizmov iz te skupine in preveriti, ali so 16S rDNK sekvene predstavnikov Skupine A prisotne tudi v prebavilih drugih (domačih) živali.

V tem delu smo zato skušali pomnožiti dele genov za 16S rRNK Skupine A iz vzorcev nekaterih domačih živali (prašiči, koza, konj, ovca, krava), treh ljudi, vampa goveda ter iz slepega in debelega črevesa kunca. Na začetku smo uporabili par začetnih oligonukleotidov MGSO-e1 in GPO-1e, ki sta poznana iz znanstvene literature, a ker pri verižni reakciji s polimerazo nismo odkrili pričakovanih produktov pomnoževanja, smo *in silico* preverili njuno ustrezost. Analiza je pokazala, da ta par začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje 16S rDNK sekvenč Skupine A ni ustrezan, zato smo se odločili, da skušamo sami poiskati bolj ustrezan par. Za iskanje smo uporabili program PRIMROSE, v nabor za izdelavo začetnih oligonukleotidov pa smo poleg sekvenč, ki so jih kot Skupino A opredelili Leser in sodelavci, vključili tudi dodatne sekvene, ki so se glede na naše rezultate uvrstile v to skupino. Filogenetske raziskave so pokazale, da se Skupina A jasno loči od ostalih skupin molikutov, kar potrjuje tudi visoka ponovljivost vozlišč, ki je bila 95-odstotna, podobnost sekvenč znotraj same skupine pa je od 81 do 100-odstodkov. Skupino A smo v programu PRIMROSE definirali kot tarčno skupino, sekvene glavnih

skupin molikutov, '*Candidatus Bacilloplasma*', '*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*' ter molikske sekvence iz prebavil termotrov pa kot sekvence, ki naj jih pripravljena začetna oligonukleotida ne bi prepoznala. S programom PRIMROSE smo pripravili 12 možnih začetnih oligonukleotidov in z orodjem ProbeMatch v RDP-II preverili njihovo specifičnost. Ker se je specifičnost vsakega izmed 12 možnih začetnih oligonukleotidov ob dovoljeni eni ali dveh napakah pri naleganju močno poslabšala, smo se odločili, da poiščemo par začetnih oligonukleotidov (MolA 352f in MolA 1224r), ki združuje dve lastnosti, čimvečjo specifičnost in velikost PCR pomnožkov vsaj 800 nt (v našem primeru približno 880 nt), kar je v primeru določanja nukleotidnega zaporedja zadostna velikost za zanesljivo filogenetsko umestitev. Za izbiro restriktivne endonukleaze *PaeI*, s katero smo poskusili še dodatno povečati zanesljivost detekcije molikutov Skupine A, smo uporabili spletno orodje NebCutter, iskali pa smo takšno restriktivno endonukleazo, ki reže PCR pomnožke sekvenc 16S rDNK Skupine A, ne reže pa pomnožkov, ki nastanejo zaradi napačnega naleganja začetnih oligonukleotidov.

Za začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r smo najprej z verižno reakcijo s polimerazo v gradientu temperature določili temperaturo naleganja na matrično DNK, in sicer 47 °C. Tako nizka temperatura naleganja je možen vzrok za nastanek nespecifičnih PCR produktov. Pozitivne rezultate (PCR pomnožke) smo dobili pri vzorcih iz slepega (12SL) in debelega (12K) črevesa kunce, pri dveh vzorcih iz govejega vampa (B1, B3) ter pri dodatnem vzorcu govejega vampa (B2) ter pri enem vzorcu iz blata človeka (NF), vendar je pri zadnjih dveh vzorcih nastalo zelo malo PCR produktov, ki so bili na gelu slabo vidni kljub nanosu večje količine PCR produktov. Za restrikcijo smo pripravili 100 µl reakcijske mešanice za PCR, produkte skoncentrirali in nastavili razrez z restriktivno endonukleazo *PaeI*. Do restrikcije je prišlo le pri vzorcu iz debelega črevesa kunca (12K). Ker je bila poleg lis, ki ustrezajo razrezanem PCR produktu (približno 600 in 300 nt), vidna tudi večja količina nerazrezanega PCR produkta (približno 900 nt), sklepamo, da je med verižno reakcijo s polimerazo nastalo tudi veliko nespecifičnih PCR produktov. Na osnovi tega ne moremo trditi, da smo pomnožili odseke genov za 16S rRNK molikutov iz Skupine A. Za dokončno potrditev bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Iskanje 16S rRNK sekvenc molikutov Skupine A se je izkazalo za bolj težavno, kot smo na začetku predvidevali, a metoda določanja te skupine v premeru optimalizacije verižne

reakcije s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma MolA 352f in MolA 1224r v kombinaci z restrikcijko endonukleazo *PaeI* vsekakor kaže potencial, za odkrivanje te, dosedaj še vedno slabo poznane skupine molikutov.

## 7 VIRI

- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews*, 95, 1: 143 - 169
- Amikam D., Glaser G., Razin S. 1984. Mycoplasmas (*Mollicutes*) have a low number of rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, 158, 1: 376 – 378
- Ashelford K. E., Weightman A. J., Fry J. C. 2002. PRIMROSE: a computer programme for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 30, 15: 3481 – 3489
- Ashelford K. Primrose. 1991. Cardiff, Cardiff School of Biosciences.  
<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Primrose/index.html>: software
- Ausubel F. M., Brent R., Kingstone R. E., Moor D.D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. 1999. Current protocols in molecular biology. New York, Harvard Medical School, John Wiley & Sons: 202 str.
- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. 2007. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 35, Database issue: D21 - D25
- Bjerrum L., Engberg R. M., Leser T. D., Jensen B. B., Finster K., Pedersen K. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science*, 85, 7: 1151 – 1164
- Blanchard A., Razin S., Kenny G. E., Barile M. F. 1988. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* urease. *Journal of Bacteriology*, 170, 6: 2692 – 2697
- Brooks S. P. J., McAllister M., Sandoz M., Kalmokoff M. L. 2003. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 10: 589 – 601
- Cole J. R., Chai B., Farris R. J., Wang Q., Kulam S. A., McGarrell D. M., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2005. The ribosomal database project (RDP-II) sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 33: D294 – D296
- Daly K., Stewart C. S., Flint H. J., Shirazi-Beechey S. P. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbial Ecology*, 38: 141 – 151

- Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K., Relman D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 5728: 1635 – 1638
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merric J. M., Tomb J. F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P. C., Lucier T. S., Peterson S. N., Smith H. O., Hutchison 3rd C. A., Venter T. S. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270, 5235: 397 – 404
- Frey J. C., Rotham J. M., Pell A. N., Nizeyi J. B., Cranfield M. R., Angert E. R. 2006. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5: 3788 – 3792
- Frey J. 2002. Mycoplasmas of animals. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds). New York, Springer: 73 – 90
- Gill S. R., Pop M., DeBoy R. T., Eckburg P. B., Turnbaugh P. J., Samuel B. S., Gordon J. I., Relman D. A., Fraser – Liggett C. M., Nelson K. E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiota. *Science*, 312, 5778: 1355 – 1359
- Head I. M., Saunders J. R., Pickup R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35, 1: 1 – 21
- Himmelreich R., Hilbert h., Plagens H., Pirkl E., Li B. C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 24, 22: 4420 – 4449
- Holben W. E., Williams P., Saarinen M., Särkilahti L. K., Apajalahti J. H. A. 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microbial Ecology*, 44, 2: 175 – 185
- Hongoh Y., Deevong P., Hattori S., Inoue T., Noda S., Noparatnaraporn N., Kudo T., Ohkuma M. 2006. Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 10: 6780 – 6788
- Huang T. H., DeSiervo A. J., Yang Q. X. 1991. Effect of cholesterol and lanosterol on the structure and dynamics of the cell membrane of *Mycoplasma capricolum*. *Biophysical Journal*, 59: 691 – 702

Interni vzorci osamljene skupne DNK iz vampa goveda ter debelega in slepega črevesa kunca. 2007. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Jiangrang L., Umelaalim I., Harmon B., Hofacre C., Maurer J. J., Lee M. D. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 11: 6816 – 6824

Kazor C. E., Mitchell P. M., Lee A. M., Stokes L. N., Loesche W. J., Dewhirst F. E., Paster B. J. 2003. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2: 558 – 563

Kong F., James G., Gordon S., Zelynski A., Gilbert G. L. 2001. Species - specific PCR for identification of common contaminant *Mollicutes* in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67,7: 3195 – 3200

Kostanjšek R., Avguštin G., Drobne D., Štrus J. 2003. Morphological and molecular examination of bacteria associated with the wall of the papillate region of the gut in *Porcellio scaber* (Isopoda). V: Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Symposium of the Biology of Terrestrial Isopods, May 2001. Sfenthourakis S. (ed.). Leiden, Koninklijke Brill NV: 103 – 120

Kostanjšek R., Lapanje A., Rupnik M., Štrus J., Drobne D., Avguštin A. 2004. Anaerobic bacteria in the gut of terrestrial isopod crustacean *Procellio scaber*. *Folia Microbiologica*: 49, 2: 179 – 182

Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2002. Genetic diversity of bacteria associated with the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustaceae Isopoda). *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 171 – 179

Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2007 "Candidatus Bacilloplasma," a novel lineage of *Mollicutes* associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 17: 5566 - 5573

Kumar S., Tamura K., Nei M. 1994. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Bioscience*, 10, 2: 189 – 191

Kwok S., Chang S. Y., Sninsky J. J., Wang A. 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, 3: 39 - 47

Leser T. D., Amenuvor J. Z., Jensen T. K., Lindecrona R. H., Boye M., Møller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2: 673 - 690

- Ley R. E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C. A., Knight R. D., Gordon J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 31: 11070 – 11075
- Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J. J., Lee M. D. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 11, 6816 – 6824
- Maidak B. L., Olsen G. J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M. J., Eoese C. R. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*: 25, 1: 109 – 110
- Miles J. R. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. *Journal of General Microbiology*, 138: 1773 – 1783
- Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie*, 81: 873 – 878
- Mollicutes*. 2004. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed.: Taxonomic outline of the prokaryotes, release 5.0, May 2004. Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. G. (eds.). New York, Springer. DOI:10.1007/bergeysoutline200405  
[http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline\\_5\\_2004.pdf \(168 - 174\)](http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information, Nucleotide database. 2007. Bethesda, National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2007, 2008)
- NEBCutter V2.0. 2007. Ipswich. New England BioLabs Inc.  
<http://tools.neb.com/NEBCutter2/index.php>
- Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. 1984. London, Queen Mary University of London, Department of Chemistry  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html#300>
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Weishuber A., Amman R. I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 19: 5636 – 5643
- Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337 - 365
- Ozutsumi Y., Tajima K., Takenaka A. 2005. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 3: 499 – 506

- Pollack J. D., Williams M. V., McElhaney R. N. 1997. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classifications and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Critical Reviews in Microbiology*: 23, 4: 269 – 354
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42, 2: 414 - 470
- Razin S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). *Microbiological Reviews*, 49, 4: 419 - 455
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094 - 1156
- Razin. S. 2006. The genus *Mycoplasma* and related genera (Class *Mollicutes*). V: The prokaryotes. 3<sup>rd</sup> ed.: Vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (eds). New York, Springer: 836 – 904
- Ribosoma database project. 2007. Michigan, Michigan State University, USA.  
<http://rdp.cme.msu.edu/misc/about.jsp>
- Rivera – Tapia J. A., Cedillo-Ramírez M. L., Juárez C. G. 2002. Some biological features of *Mollicutes*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 44, 2: 53 – 57
- Robinson I. M. 1984. *Anaeroplasma*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 1. Krieg N. R., Holt J. R. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins: 787 - 90
- Robinson I. M., Allison M. J. 1975. Transfer of *Acholeplasma bactoclasticum* Robinson and Hungate to the genus *Anaeroplasma* (*Anaeroplasma bactoclasticum* [Robinson and Hungate] comb. nov.): Emended description of the species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25: 182 - 186
- Robinson I. M., Allison M. J., Hartman P. A. 1975. *Anaeroplasma abactoclasticum* sp. nov., an anaerobic mycoplasma from bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25: 173 - 181
- Robinson J. P., Hungate R. E. 1973. *Acholeplasma bactoclasticum* sp. nov., an anaerobic mycoplasma from bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 171 - 181
- Rottem S. 2003. Interactions of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 471 – 432
- rrnDB: the ribosomal RNA operon copy number database. 2008. Michigan, Michigan State University. (avgust 2008)  
<http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/index.php>

- Ryan J. L., Morowitz H. J. 1969. Partial purification of native rRNA and tRNA cistrons from *Mycoplasma* sp. Proceedings of the National Academy of Sciences, 63, 4: 1282 - 1289
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich A. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487 – 491
- Savage J. M. 1995. Systematics and the biodiversity crisis. BioScience, 45, 10: 673 -679
- Seemüller E., Schneider B., Mäurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K. H., Firrao G., Avinte L., Sears B. B., Stackenbrandt E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 3: 440 – 446
- Seto S., Miyata M. 1998. Cell reproduction and morphological changes in *Mycoplasma capricolum*. Journal of Bacteriology, 180, 20: 256 – 264
- Simpson J M., Santo Domingo J. W., Reasoner D. J. 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. FEMS Microbial Ecology, 47, 1: 65 – 75
- Staley J. T., Konopka A. 1985. Measurment of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Reviews in Microbiology, 39: 321 – 346
- Stanbridge E. 1971. Mycoplasmas and cell cultures. Bacteriological Reviews, 35, 2: 206 – 227
- Stewart C. S., Flint H. J., Bryant M. P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2<sup>nd</sup> ed. Hobson P. N., Stewart C. S. (eds). New York, Springer: 21 - 77
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J. J., Gibson G. R., Collins M. D., Doré J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNK from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 4799 – 4807
- Suzuki M., Rappé M. S., Giovannoni S. J. 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplifikon lenght heterogeneity. Applied and Environmental Microbiology, 64, 11: 4522 – 4529
- Tajima K., Aminov R. I., Nagamine T., Ogata K., Nakamura M., Matsui H., Benno Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbial Ecology, 29: 159 – 169

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2005. MEGA 3.1: Molecular evolutionary genetics analysis. <http://www.megasoftware.net/index.html>: software
- Tham T. N., Ferris S., Kovacic R., Montagnier L., Blanchard A. 1993. Identification of *Mycoplasma pirum* Genes involved in the salvage pathways for nucleosides. Journal of Bacteriology, 175, 16: 5281 – 5285
- Trachtenberg S. 1998. Mollicutes – Wall-less bacteria with internal cytoskeletons. Journal of Structural Biology,: 124: 244 – 256
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., Gordon J. I., 2006. An obesity – associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature, 444, 7122: 1027 – 1031
- Van Kuppeveld F. J. M., Johansson K. E., Galama J. M. D., Kissing J., Bölske G., Van der Logt J. T. M., Melchers W. J. G. 1994. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures ba a mycoplasma group-specific PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 1: 149 – 152
- Wang G. C., Wang Y. 1996. The frequency of chimeric molecules as consequences of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiology, 142: 1107 - 1114
- Wang Y., Stingl U., Anton-Erxleben F., Geisler S., Brune A., Zimmers M. 2004. "*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*," a new, stalk-forming lineage of *Mollicutes* colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. Applied and Environmental Microbiology, 70, 10: 6166 – 6172
- Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L., Petzel J. P., Oyaizu H., Yang D., Mendelco L., Sechrest J., Lawrence T. G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C. R. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. Journal of Bacteriology, 171, 12: 6455 – 6467
- Wheeler D. L., Barrett T., Benson D. A., Bryant S. H., Canese K., Chetvernin V., Church D. M., DiCuccio M., Edgar R., Federhen S., Geer L. Y., Kapustin Y., Khovayko O., Landsman D., Lipman D. J., Madden T. L., Maglott D. R., Ostell J., Miller V., Pruitt K. D., Schuler G. D., Sequeira E., Sherry S. T., Sirotnik K., Souvorov A., Starchenko G., Tatusov R. L., Tatusova T. A., Wagner L., Yaschenko E. 2006. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research, 35, Database issue: D5 - D12
- Woese C. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 50, 2: 221 – 271
- Woese C. R., Fox G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Evolution, 74, 11: 5088 – 5090

## ZAHVALE

Rada bi se zahvalila vsem, ki so sodelovali pri nastanku tega diplomskega dela. Posebej bi se rada zahvalila:

- mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za mentorstvo, nasvete in moralno podporo;
- vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno tehnologije za nasvete, strpnost in prijaznost;
- Darji za vso pomoč in vedno nasmejan obraz;
- dr. Tomažu Accettu za vse nasvete;
- Luki za Agilent in še kaj;
- Gasanu za presek sekvenc;
- dr. Dušanu Benčini za hitro recenzijo;
- Bredi za lektoriranje;
- staršema Nataši in Franciju ter sestri Sergeji za potrpežljivost in podporo tekom mojega (predolgega) študija;
- Matevžu ker je vedno na moji strani

## PRILOGE

**Priloga A1:** Seznam sekvenc, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: Skupina A

### Skupina A

| Oznaka                | Klasifikacija (RDP-II) | Izvor sekvence            | Avtor                   |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| AY985226              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AY985472              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AF371524 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AJ608245              | neuvrščeni firmikuti   | biopsija črevesne razjede | Hutson in Collins, 2005 |
| AF371522 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AF371523 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AF371526 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| DQ353915              | neuvrščeni firmikuti   | blato divje gorile        | Frey in sod., 2006      |
| AF001770 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | vamp                      | Tajima in sod., 1999    |
| AY977312              | neuvrščeni firmikuti   | človeški cekum            | Eckburg in sod., 2005   |
| AF132233 <sup>a</sup> | neuvrščene bakterije   | človeško blato            | Suau in sod., 1999      |
| AF371525 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AY916186              | neuvrščeni firmikuti   | debelo črevo človeka      | Eckburg in sod., 2005   |
| AF371528 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AY993101              | neuvrščeni firmikuti   | mišji cekum               | Ley in sod., 2005       |
| AF371527 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AY985531              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| DQ325660              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Gill in sod., 2005      |
| AY985422              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AB234516              | neuvrščeni firmikuti   | črevesje termita          | Hongoh in Ohkuma, 2005  |
| DQ325546              | neuvrščene bakterije   | človeško blato            | Gill in sod., 2005      |
| DQ057362              | neuvrščeni firmikuti   | piščančji ileum in cekum  | Bjerrum in sod., 2005   |
| AY239433              | neuvrščeni firmikuti   | podganje blato            | Brooks in sod., 2003    |
| AF001741 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | vamp                      | Tajima in sod., 1999    |
| AB234515              | neuvrščeni firmikuti   | črevesje termita          | Hongoh in sod., 2006    |
| DQ353904              | neuvrščeni firmikuti   | blato divje gorile        | Frey in sod., 2006      |
| AF371529 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| DQ326418              | neuvrščeni firmikuti   | blato divje gorile        | Frey in sod., 2006      |
| AF132232 <sup>a</sup> | neuvrščene bakterije   | človeško blato            | Suau in sod., 1999      |
| AY985632              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AB185687              | neuvrščeni firmikuti   | vamp                      | Ozutsumi in sod., 2005  |
| AB185684              | neuvrščeni firmikuti   | vamp                      | Ozutsumi in sod., 2005  |
| AF432140              | neuvrščeni firmikuti   | bris človeškega jezika    | Kazor in sod., 2003     |
| AY980362              | neuvrščeni firmikuti   | človeški rektum           | Eckburg in sod., 2005   |
| AY916353              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AY916325              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AF371530              | neuvrščeni firmikuti   | črevesje prašiča          | Leser in sod., 2002     |
| AY986020              | neuvrščeni firmikuti   | človeško blato            | Eckburg in sod., 2005   |
| AY212765              | neuvrščeni firmikuti   | konjsko blato             | Simpson in sod., 2003   |
| AF001742 <sup>a</sup> | neuvrščeni firmikuti   | vamp                      | Tajima in sod., 1999    |

<sup>a</sup> – sekvence na osnovi katerih smo s programom PRIMROSE izdelali začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r  
(T) – tipski sev

**Priloga A2:** Seznam sekvenč, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: *Acholeplasma/AnaeroplasmaI, Candidatus Bacilloplasma, Candidatus Hepatoplasma crinocheterorum, Termitska skupina*

***Acholeplasma/Anaeroplasma***

| Oznaka     | Klasifikacija (RDP-II)              | Izvor sekvence        | Avtor                       |
|------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| AJ311394   | <i>Acholeplasma axanthum</i>        |                       | Seemueller in Yegorov, 2001 |
| M23933 (T) | <i>Acholeplasma modicum</i>         |                       | Weisburg in sod., 1989      |
| DQ003614   | <i>Mycoplasmataceae genomosp.</i>   | ustna votlina človeka | Baldwin in sod., 2005       |
| M23934 (T) | <i>Anaeroplasma varium</i>          |                       | Weisburg in sod., 1989      |
| M25049 (T) | <i>Anaeroplasma bactoclasticum</i>  |                       | Weisburg in sod., 1989      |
| M25050 (T) | <i>Anaeroplasma abactoclasticum</i> |                       | Weisburg in sod., 1989      |
| U14905 (T) | <i>Acholeplasma laidlawii</i>       |                       | Artiushin in sod., 1995     |
| AF268406   | <i>Aster yellows phytoplasma</i>    |                       | Lee in sod., 2002           |
| AI964959   | <i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>  |                       | Torres in sod., 2005        |
| AF200718   | <i>Cactus phytoplasma</i>           |                       | Leyva-Lopez in sod., 1999   |
| AJ632156   | <i>Candidatus Phytoplasma pini</i>  |                       | Schneider in sod., 2005     |

***Candidatus Bacilloplasma***

| Oznaka   | Klasifikacija (RDP-II) | Izvor sekvence                        | Avtor                    |
|----------|------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| AF395313 | neuvrščeni firmikuti   | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Kostanjšek in sod., 2001 |
| AF395322 | neuvrščeni firmikuti   | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Kostanjšek in sod., 2001 |
| DQ340200 | neuvrščeni bacili      | črevesje <i>Gillichthys mirabilis</i> | Bano in sod., 2007       |
| AF395316 | neuvrščeni firmikuti   | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Kostanjšek in sod., 2001 |
| AF395319 | neuvrščeni firmikuti   | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Kostanjšek in sod., 2001 |
| AF395315 | neuvrščeni firmikuti   | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Kostanjšek in sod., 2001 |

***Candidatus Hepatoplasma crinocheterorum***

| Oznaka   | Klasifikacija (RDP-II)                         | Izvor sekvence                        | Avtor              |
|----------|--|---------------------------------------|--------------------|
| AY500249 | <i>Candidatus Hepatoplasma crinocheterorum</i> | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Wang in sod., 2004 |
| AY500250 | <i>Candidatus Hepatoplasma crinocheterorum</i> | črevesje <i>Porcellio scaber</i>      | Wang in sod., 2004 |
| AY539724 | neuvrščena <i>Mycoplasmataceae</i>             | heaptopankreas <i>Oniscus asellus</i> | Wang in sod., 2004 |

**Termitska skupina**

| Oznaka   | Klasifikacija (RDP-II)             | Izvor sekvence  | Avtor                  |
|----------|------------------------------------|-----------------|------------------------|
| AB089056 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Hongoh in sod., 2003   |
| AB192228 | neuvrščena <i>Mycoplasmataceae</i> | črvesje termita | Hongoh in sod., 2005   |
| AB089053 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Hongoh in sod., 2003   |
| AB192181 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Hongoh in sod., 2003   |
| AB062837 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Shinzato in sod., 2005 |
| AB062809 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Shinzato in sod., 2005 |
| AB089055 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Hongoh in sod., 2003   |
| AY571419 | neuvrščeni firmikuti               | črvesje termita | Yang in sod., 2005     |

<sup>a</sup> – sekvenče na osnovi katerih smo s programom PRIMROSE izdelali začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r  
(T) – tipski sev

**Priloga A3:** Seznam sekvenč, ki smo jih uporabili pri izdelavi začetnih oligonukleotidov MolA 352f in MolA 1224r: Skupina B, Ostali

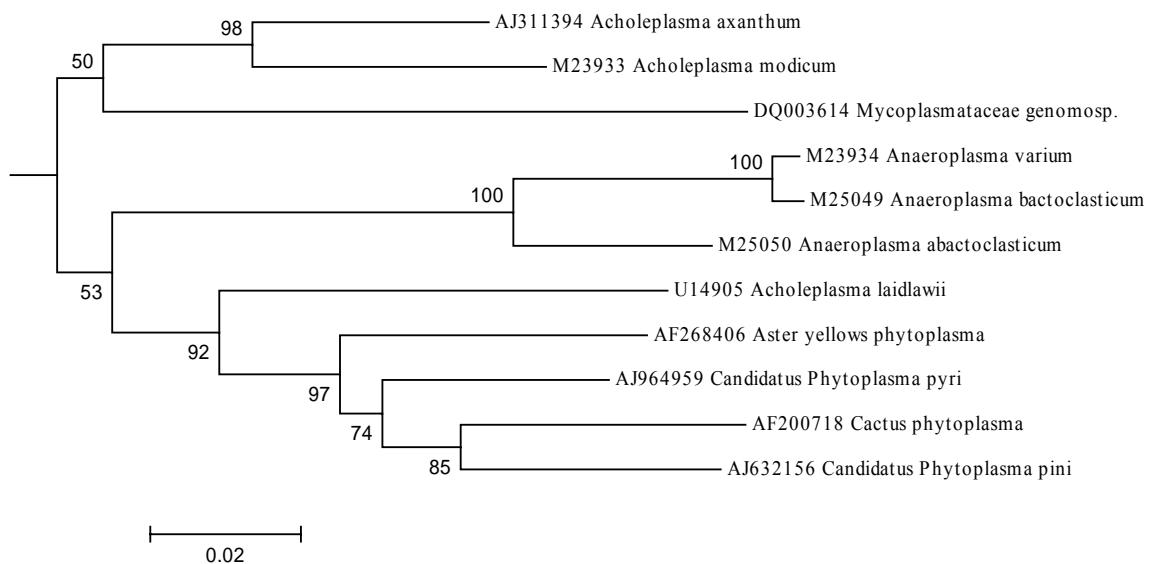
**Skupina B**

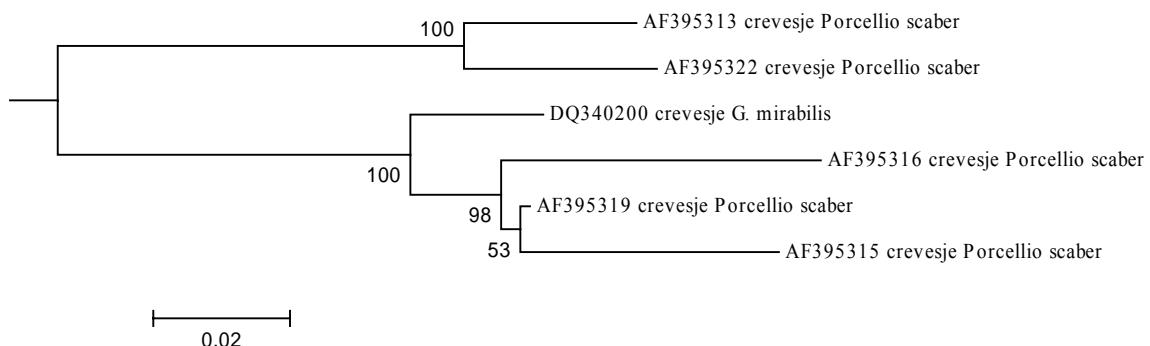
| Oznaka   | Klasifikacija (RDP-II)           | Izvor sekvence       | Avtor                     |
|----------|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| DQ837630 | <i>Paralactobacillus</i> sp.     | črevesje čebele      | Babendreier in sod., 2007 |
| AY571415 | neuvrščeni firmikuti             | črevesje prašiča     | Yang in sod., 2005        |
| DQ353903 | neuvrščeni firmikuti             | blato divje gorile   | Frey in sod., 2006        |
| AF371513 | <i>Allobaculum</i> sp.           | črevesje prašiča     | Leser in sod., 2002       |
| AF371514 | neuvrščeni firmikuti             | črevesje prašiča     | Leser in sod., 2002       |
| DQ353926 | <i>Allobaculum</i> sp.           | blato divje gorile   | Frey in sod., 2006        |
| M23730   | <i>Streptococcus pleomorphus</i> |                      | Weisburg in sod., 1989    |
| AY916182 | neuvrščeni firmikuti             | debelo črevo človeka | Eckburg in sod., 2005     |
| L34616   | <i>Eubacterium cylindroides</i>  | Izvor sekvence       | Ludwig in Woese, 2000     |
| AY983957 | <i>Catenibacterium</i> sp.       | debelo črevo človeka | Eckburg in sod., 2005     |
| DQ326032 | <i>Catenibacterium</i> sp.       | človeško blato       | Gill in sod., 2005        |
| AY977997 | <i>Catenibacterium</i> sp.       | človeški cekum       | Eckburg in sod., 2005     |
| AY975981 | <i>Catenibacterium</i> sp.       | človeški cekum       | Eckburg in sod., 2005     |
| AY982122 | <i>Coprobacillus</i> sp.         | debelo črevo človeka | Eckburg in sod., 2005     |
| AY984785 | <i>Coprobacillus</i> sp.         | človeško blato       | Eckburg in sod., 2005     |
| AY975472 | <i>Coprobacillus</i> sp.         | debelo črevo človeka | Eckburg in sod., 2005     |
| AY978754 | <i>Coprobacillus</i> sp.         | debelo črevo človeka | Eckburg in sod., 2005     |
| DQ327212 | <i>Coprobacillus</i> sp.         | človeško blato       | Gill in sod., 2005        |

**Ostali**

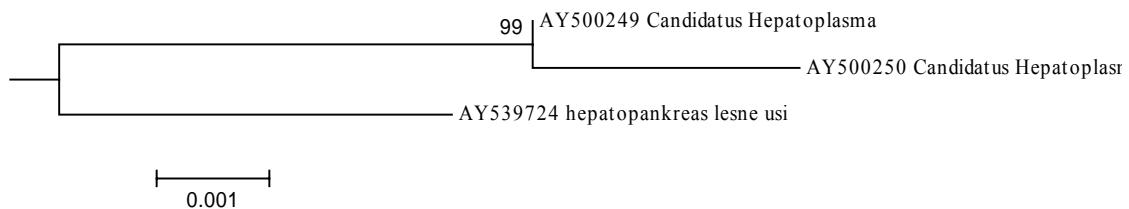
| Oznaka       | Klasifikacija (RDP-II)          | Izvor sekvence                        | Avtor                     |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| DQ443905     | <i>Veillonella</i> sp.          | sulfat reducirajoči bioreaktor        | Zhao in sod., 2006        |
| AB175382     | neuvrščene Clostridiaceae       | Anaerobna razgradnja BSA              | Tang in sod., 2005        |
| AY854280     | neuvrščeni Clostridiales        | GI trakt <i>Bos indicus</i>           | Nelson in sod., 2003      |
| AB009230     | neuvrščeni firmikuti            | vamp                                  | Kiyoshi in Tajima, 2003   |
| AF454301     | neuvrščeni firmikuti            | Mono Lake                             | Humayoun in sod., 2004    |
| AF507895     | neuvrščeni firmikuti            | Mono Lake                             | Humayoun in sod., 2004    |
| AF001736     | neuvrščeni firmikuti            | vamp                                  | Tajima in sod., 1999      |
| AB009179     | neuvrščeni firmikuti            | vamp                                  | Tajima, 2005              |
| AB218321     | neuvrščeni firmikuti            | blato morske krave                    | Tsukinowa in sod., 2005   |
| AY166838     | neuvrščeni firmikuti            | <i>Ecteinascidia turbinata</i>        | Moss in sod., 2003        |
| AJ515720     | neuvrščeni firmikuti            | Črevesje <i>Rimicaris exoculata</i>   | Zbinden, Cambon, 2003     |
| X63781       | <i>Spiroplasma citri</i>        |                                       | Laigret, 1991             |
| AY538169     | <i>Acholeplasma multilocale</i> | zajec, konj                           | Johansson, 2004           |
| AF202925     | <i>Mycoplasma capricolum</i>    |                                       | Heldtander, 2001          |
| AY187288 (T) | <i>Mesoplasma tabanidae</i>     |                                       | Knight in Gasparich, 2002 |
| AJ002268     | <i>Mycoplasma hominis</i>       |                                       | Mygind, 1997              |
| AJ419905     | <i>Mycoplasma bovis</i>         |                                       | Vilei, 2001               |
| DQ157157     | <i>Mycoplasma haemofelis</i>    |                                       | Willi in sod., 2006       |
| AF073454     | <i>Ureaplasma urealyticum</i>   |                                       | Kong in sod., 1999        |
| DQ340194     | <i>Mycoplasma</i> sp.           | črevesje <i>Gillichthys mirabilis</i> | Bano in sod., 2005        |

<sup>a</sup> – sekvenč na osnovi katerih smo s programom PRIMROSE izdelali začetna oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r  
 (T) – tipski sev

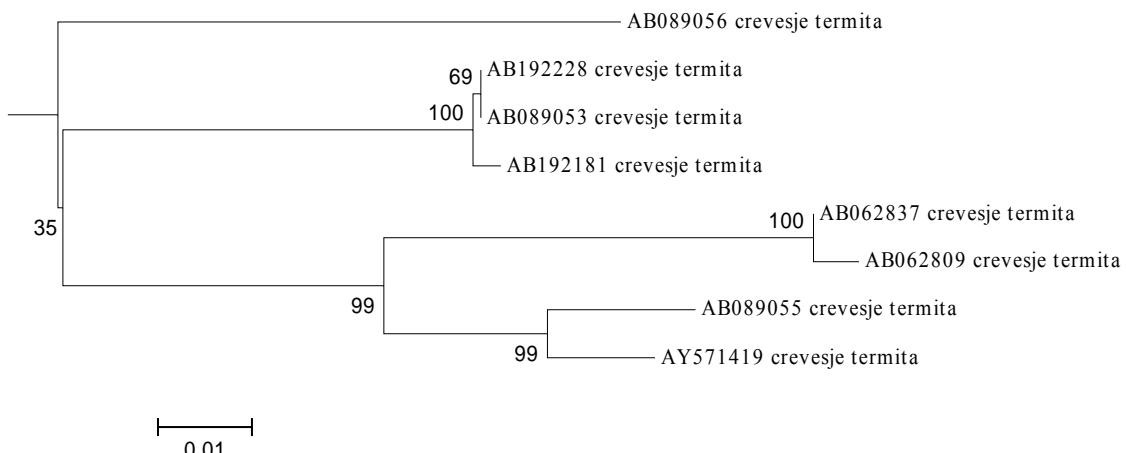
**Priloga B:** Prikaz poddrevesa *Acholeplasma/Anaeroplasma*



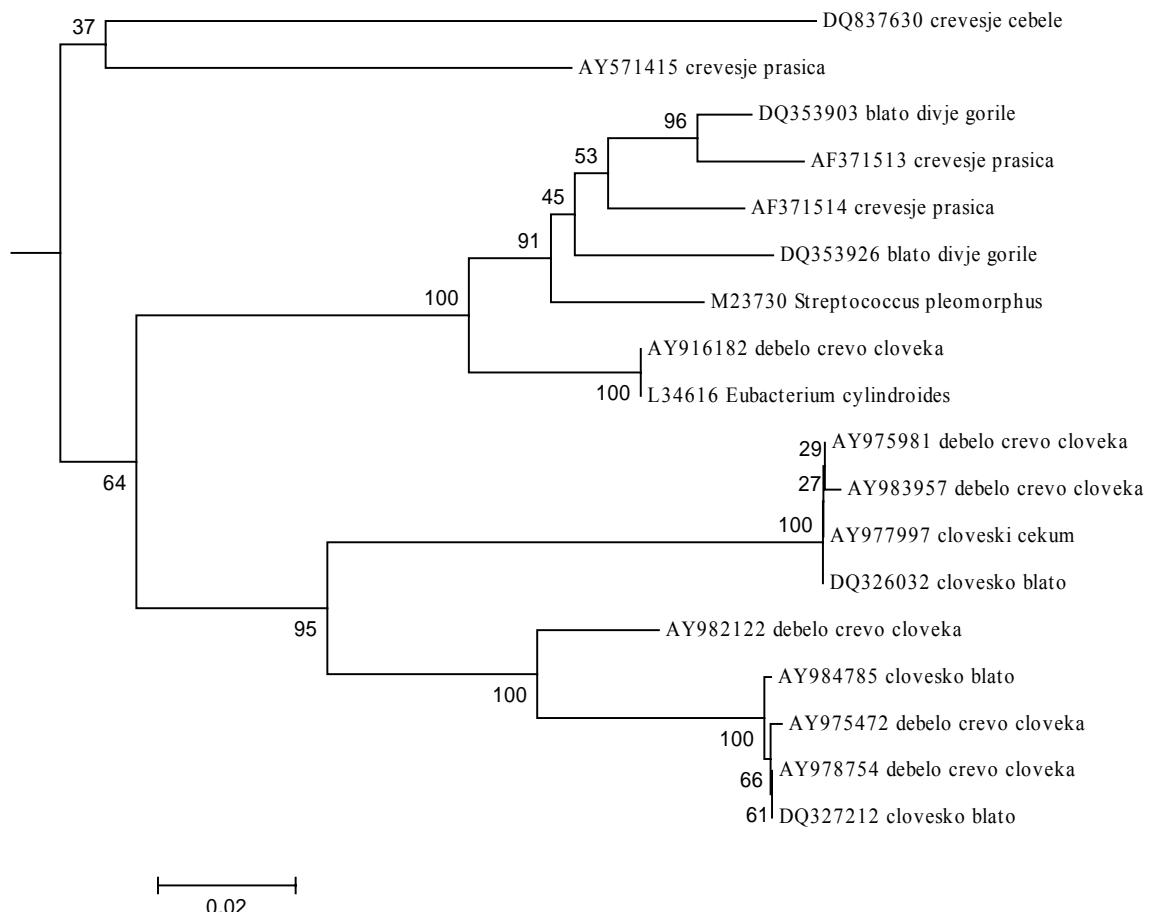
**Priloga C:** Prikaz poddrevesa '*Candidatus Bacilloplasma*'



**Priloga D:** Prikaz poddrevesa '*Candidatus Hepatoplasma crinochetonum*'



**Priloga E:** Prikaz poddrevesa Termska skupina



**Priloga F:** Prikaz poddrevesa Skupina B

### Priloga G: DNK distance med 16S rRNK sekvencami Skupine A

No. of Taxa : 40  
Data Type : Nucleotide (Coding)  
Analysis : Pairwise distance calculation  
Compute : Distances only  
Gaps/Missing Data : Complete Deletion  
Codon Positions : 1st+2nd+3rd+Noncoding  
Model : Nucleotide: Kimura 2-parameter  
Substitutions to Include : d: Transitions + Transversions  
Pattern among Lineages : Same (Homogeneous)  
Rates among sites : Uniform rates  
No. of Sites : 1102

[ 1] AF371524 crevesje prasica  
[ 2] AY985226 clovesko blato  
[ 3] AY985472 clovesko blato  
[ 4] AF371522 crevesje prasica  
[ 5] AF371523 crevesje prasica  
[ 6] AJ608245 biopsija crevesne razjede  
[ 7] AF132233 clovesko blato  
[ 8] AF371525 crevesje prasica  
[ 9] AY9777312 cloveski cekum  
[10] DQ353915 blato divje gorile  
[11] AF001770 vamp  
[12] AF371526 crevesje prasica  
[13] DQ353904 blato divje gorile  
[14] AF371529 crevesje prasica  
[15] AB234515 crevesje termita  
[16] AB234516 crevesje termita  
[17] DQ057362 piscancji ileum in cekum  
[18] DQ325546 clovesko blato  
[19] AY239433 podganje blato  
[20] AF001741 vamp  
[21] AF371528 crevesje prasica  
[22] AF371527 crevesje prasica  
[23] AY993101 misji cekum  
[24] DQ325660 clovesko blato  
[25] AY985531 clovesko blato  
[26] AY985422 clovesko blato  
[27] AY916186 debelo crevo cloveka  
[28] DQ326418 clovesko blato  
[29] AF132232 clovesko blato  
[30] AY980362 cloveski rektum  
[31] AY916353 clovesko blato  
[32] AY916325 clovesko blato  
[33] AF371530 crevesje prasica  
[34] AF432140 bris\_cloveskega jezika  
[35] AB185687 vamp  
[36] AB185684 vamp  
[37] AY985632 clovesko\_blatu  
[38] AY212765 konjsko\_blatu  
[39] AF001742 vamp  
[40] AY986020 clovesko blato



**Priloga H:** Prikaz pozicije napačnega naleganja na 16S rRNA sekvene, ki jih najdeti oligonukleotida MolA 352f in MolA 1224r od dovoljenih dveh napakah

| Ime      | MolA 352f |       |       |       |       | MolA 1224r <sup>a</sup> |     |       |       |       |
|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|-----|-------|-------|-------|
|          | CAG       | CAG   | TTA   | GGA   | ATA   | ACA                     | GGY | GTG   | CTA   | YAA   |
| AF052418 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AF052421 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AF371564 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY212761 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AF527773 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY854265 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY858466 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY960569 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY975719 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY977280 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY979071 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY981600 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY983463 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ057372 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ085084 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB185576 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY989936 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY990021 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY991574 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ014615 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB239486 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB192170 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB234497 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ326299 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY995262 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ377946 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ394701 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ809578 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ805808 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ803192 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ802337 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ800243 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ797393 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ795760 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ794644 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AJ811983 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| EF099996 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| EF098078 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| EF096344 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ441359 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ890427 | .....     | ..... | ..... | T     | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB270122 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB270022 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ777880 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB255919 | .....     | AG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ815641 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ673542 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ340058 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| DQ339887 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY992621 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AB034122 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AY166837 | .....     | A.    | ..... | T     | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AF132245 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |
| AJ408969 | .....     | GG    | ..... | ..... | ..... | .....                   | AC  | ..... | ..... | ..... |

A – reverzni komplement začetnega oligonukleotida MolA 1224r