

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja DULAR

OZNAČEVALNI GENI PROBIOTIČNEGA SEVA BAKTERIJE *Bacillus subtilis* KBL-001 - ORODJE ZA ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI TER ZAŠČITO INDUSTRIJSKE LASTNINE

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MARKER GENES OF *Bacillus subtilis* KBL-001 - TOOL FOR
QUALITY ASSURANCE AND THE PROTECTION OF INDUSTRIAL
PROPERTY**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v farmacevtskem podjetju Krka, d.d. v Novem mestu, na Oddelku za biokemijo.

Elektroforeza končnih izolatov je bila narejena na Univerzi v Ljubljani, na Biotehniški fakulteti, Oddelek za biologijo, zaporedje DNA je bilo analizirano v podjetju Macrogen v Seulu v Koreji.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorja dr. Aleša Gaspariča in za recenzentko prof. dr. Ireno Rogelj.

Mentorica: prof.dr. Darja Žgur Bertok

Somentor: dr. Aleš Gasparič

Recenzentka: prof.dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Aleš Gasparič

Krka, d.d., Novo mesto

Članica prof. dr. Irena Rogelj

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja DULAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 602.3+608.5:579.852.11:577.212.3 (043)=163.6
KG *Bacillus subtilis*/tehnološko pomembni mikroorganizmi/probiotiki/intelektualna lastnina/sledenje mikroorganizmov/označevalni geni / PCR
AV DULAR, Anja
SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/ GASPARIČ, Aleš (somentor)/ ROGELJ, Irena (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN OZNAČEVALNI GENI PROBIOTIČNEGA SEVA BAKTERIJE *Bacillus subtilis*
KBL-001 – ORODJE ZA ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI TER ZAŠČITO
INDUSTRIJSKE LASTNINE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 59 str., 6 pregl., 8 sl., 3 pril., 21 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Probiotični sev *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS117162) je lastni izolat laboratorijskega farmacevtskega podjetja Krka, d.d. v Novem mestu. V probiotični proizvod so vgrajene spore tega mikroorganizma. Za obvladovanje kakovosti izdelka skozi titer probiotičnega mikroorganizma ter za zagotavljanje istovetnosti vgrajenega mikroorganizma (*Bacillus subtilis* KBL 001) so v Krki, d.d. razvili ustrezne mikrobiološke, fizikalno-kemijske ter molekularno biološke postopke. Naša naloga je bila določiti DNA zaporedja nekaterih označevalnih genov (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy in nprB*) ter le-to uporabiti kot orodje za sledenje, oziroma preverjanje istovetnosti mikroorganizmov v izdelkih, po drugi strani pa so te metode nujne tudi za zaščito lastnega seva (*Bacillus subtilis* KBL 001) pred morebitnimi krajami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.3+608.5:579.852.11:577.212.3 (043)=163.6
CX *Bacillus subtilis*/technologically important microorganisms/probiotics/intellectual property/microorganism tracking/ marker genes// PCR
AU DULAR, Anja
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/GASPARIČ, Aleš (co-advisor)/ROGELJ, Irena (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI MARKER GENES OF *Bacillus subtilis* KBL-001 – TOOL FOR QUALITY ASSURANCE AND PROTECTION OF INDUSTRIAL PROPERTY
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 59 p., 6 tab., 8 fig., 3 ann., 21 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The probiotic strain *Bacillus subtilis* - KBL 001 (CBS117162) is an isolate from pharmaceutical company Krka, d.d. laboratories from Novo mesto. Spores of this microorganism are included into a probiotic product. For quality control the titer (CFU - colony forming units) of probiotic microorganism and the identification of embedded microorganism, (*Bacillus subtilis* KBL 001) microbiological, physical-chemical and molecular-biological procedures were developed in Krka, d.d.. Our task was to determine the DNA sequence of some marker genes (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy in nprB*) and use them as a tool for tracking and identification of microorganisms in the products. In addition, these methods are also necessary for protection of the strain (*Bacillus subtilis* - KBL 001) against possible theft .

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
1.1.1 <i>Namen dela</i>	2
1.1.2 <i>Delovne hipoteze</i>	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O BAKTERIJI <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> KOT PROBIOTIK	5
2.3 MIKROBNI ENCIMI	7
2.4 INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA MIKROBNIH ENCIMOV	8
2.5 EKSTRACELULARNI PROTEINI <i>B. subtilis</i>	9
2.6 INTELEKTUALNA LASTNINA	10
2.6.1 Prijava patenta za mikroorganizme	11
2.6.1.1 <i>Prvotni depozit</i>	12
2.7 ORODJA ZA PREPOZNAVANJE IN SLEDENJE MIKROORGANIZMOV.....	13
3 MATERIAL IN METODE.....	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 <i>Kemikalije</i>	16
3.1.2 <i>Bakterijski sevi.....</i>	17
3.1.3 <i>Izbrani geni</i>	17
3.1.4 <i>Sestava gojišč</i>	18
3.1.5 <i>Priprava pufrov in drugih raztopin.....</i>	19
3.2 METODE	22
3.2.1 <i>Priprava kompetentnih celic</i>	22
3.2.2 <i>Elektroforeza.....</i>	22
3.2.3 <i>Transformacija</i>	23
3.2.4 <i>Izolacija plazmidne DNA</i>	24
<i>Izolacija plazmidne DNA s kitom GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)</i>	24
3.2.5 <i>Izolacija kromosomske DNA</i>	25
3.2.6 <i>Čiščenje plazmidne DNA z uporabo kompleta GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)</i>	26
3.2.7 <i>PCR</i>	26
3.2.8 <i>Ligacija z uporabo sistema pGEM-T Easy Vector</i>	28

3.2.9 Izbira začetnih oligonukleotidov	29
4 REZULTATI.....	31
4.1 IZOLACIJA KROMOSOMSKE DNA	31
4.2 PCR.....	31
4.3 KLONIRANJE IZBRANIH GENOV SEVA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> KBL 001	35
4.4 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA	35
4.5 ANALIZA SEKVENC	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	46
5.1 RAZPRAVA.....	46
5.2 SKLEPI.....	50
6 POVZETEK	51
7 VIRI	53

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)	6
Preglednica 2: Izbrani geni bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , katere smo že leli izolirati	17
Preglednica 3: Poimenovanje obravnavanih genov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> KBL 001	28
Preglednica 4: Izbrani oligonukleotidni začetniki	29
Preglednica 5: Seznam neujemanj in vrzeli ujemajočih delov sekvenc našega seva v primerjavi s tipskim sevom <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	44
Preglednica 6: Rezultati analize sekvenc, izoliranih iz bakterije <i>Bacillus subtilis</i> KBL 001	48

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz kolonij bakterij <i>Bacillus subtilis</i> (Wikipedia, 2009)	3
Slika 2: <i>Bacillus subtilis</i> med sporulacijo (Wikipedia, 2009)	4
Slika 3: pGEM ® - T Easy Vector (Promega, 2009)	28
Slika 4: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 1	31
Slika 5: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 2 (vzorci 1 – 10)	32
Slika 6: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 2 (vzorci 11 – 20)	33
Slika 7: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 3	34
Slika 8: Elektroforeza izolirane plazmidne DNA	35

KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A: Seznam restrikcijskih encimov, uporabljenih za kreiranje restrikcijske mape	57
Priloga B: Restrikcijska mapa produktov PCR	58
Priloga C: Simulacija gelske elektroforeze	59

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	- dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov, angl. Amplified fragment length polymorphism
Amp	- ampicilin
AP-PCR	- PCR s poljubnimi začetnimi oligonukleotidi, angl. Arbitrarily primed PCR
ARDRA	- restriksijska analiza pomnožene rDNA, angl. Amplified rDNA restriction analysis
bp	- bazni par
CTAB	- N – cetil –N,N,N trimetilamonijev bromid
DNA	- deoksiribonukleinska kislina, angl. Deoxyribonucleic Acid
EDTA	- etilendiamin tetraacetna kislina
IDA	- mednarodna depozitarna avtoriteta, angl. International Depository Authority
IPTG	- izopropil-β-D-1-tiogalaktosid
KE	- kolonijske enote
LB	- Luria Bertanijevo gojišče
PCR	- verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo, angl. polymerase chain reaction
qPCR	- kvantitativni PCR
RAPD	- naključno pomnoževanje polimorfne DNA, angl. Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	- tehnika polimorfnih restriksijskih fragmentov, angl. Restriction fragment length polymorphism
SDS	- natrijev dodecil sulfat
STET	- saharoza, tris, EDTA, triton

TBE	- tris, borat, EDTA
TE	- tris, EDTA
WIPO	- Svetovna organizacija za intelektualno lastnino, angl. World Intellectual Property Organization ,
X-gal	- gal, bromo-kloro-indolil-galaktopiranozid

1 UVOD

Na Zemlji obstaja veliko različnih oblik življenja. Najstarejša in najbolj raznolika oblika življenja so mikroorganizmi. Mikroorganizmi skupaj z makroorganizmi skrbijo za pretok snovi skozi ekosistem. Igrajo pomembno vlogo v življenju rastlin in živali. Lahko delujejo kot njihovi simbionti in tako preprečujejo rast škodljivih mikroorganizmov. Navkljub njihovi majhnosti in preprosti celični zgradbi, so izjemne biokemijske tovarne. Sposobne so pretvorbe enostavnih molekul v kompleksne biološke molekule in obratno. Tako ljudje, kot rastline in živali, so žive zbirke bakterij. Zagotavljajo hrano in življenjski prostor za veliko število bakterij, največ bakterij pa je v prebavnem traktu. Bakterije v prebavnem traktu pomagajo pri prebavi, prebavni trakt pa jim nudi ustrezen življenjsko okolje za prehranjevanje in podvajanje. V prebavilih mikroorganizmi razgradijo snovi, katerih gostiteljski organizem ne more, ali pa ni sposoben razgraditi zaradi pomanjkanja ustreznih encimov. Tako je hrana, ki jo gostiteljski organizem užije, bolj razgrajena, boljši pa je tudi energijski izplen. Mikroorganizmi tudi ščitijo prebavni trakt z interakcijo z drugimi, morda škodljivimi mikroorganizmi.

Z namenom, da bi se krma monogastričnih živali lahko čim bolje razgradila v njihovem prebavnem traktu, so začeli uporabljati krmne dodatke, ki vsebujejo različne probiotike ali pa encime. Monogastične živali namreč nimajo ustrezne mikroflore v črevesju, ki bi bila sposobna razgrajevati kompleksnejše molekule, kot sta na primer hemiceluloza in ksilan. Krma lahko namreč vsebuje veliko hemiceluloze, ki povzroči večjo viskoznost črevesne vsebine, posledično pa se zmanjša absorpcija hrani v telo, lahko se tudi poveča število mikroorganizmov (tudi patogenih). Z dodajanjem določenih krmnih dodatkov pa se tem težavam lahko izognemo – probiotiki, ki izločajo določene encime, ali pa encimi sami, pripomorejo k boljši prebavi, ustrejni mikroflori črevesja, boljši absorpciji hrani v telo in boljšemu energetskemu izplenu. Tako so živali bolj zdrave, večja pa je tudi njihova prirast.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

1.1.1 Namen dela

Naša naloga je bila določiti zaporedja DNA nekaterih označevalnih genov (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy in nprB*) v probiotičnem sevu *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS117162). Izsledke bodo uporabili kot orodje za sledenje, oziroma preverjanje istovetnosti mikroorganizmov v izdelkih, po drugi strani pa so rezultati te naloge uporabni tudi v kontekstu zaščite lastnega seva (*Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS117162)) pred morebitnimi krajami.

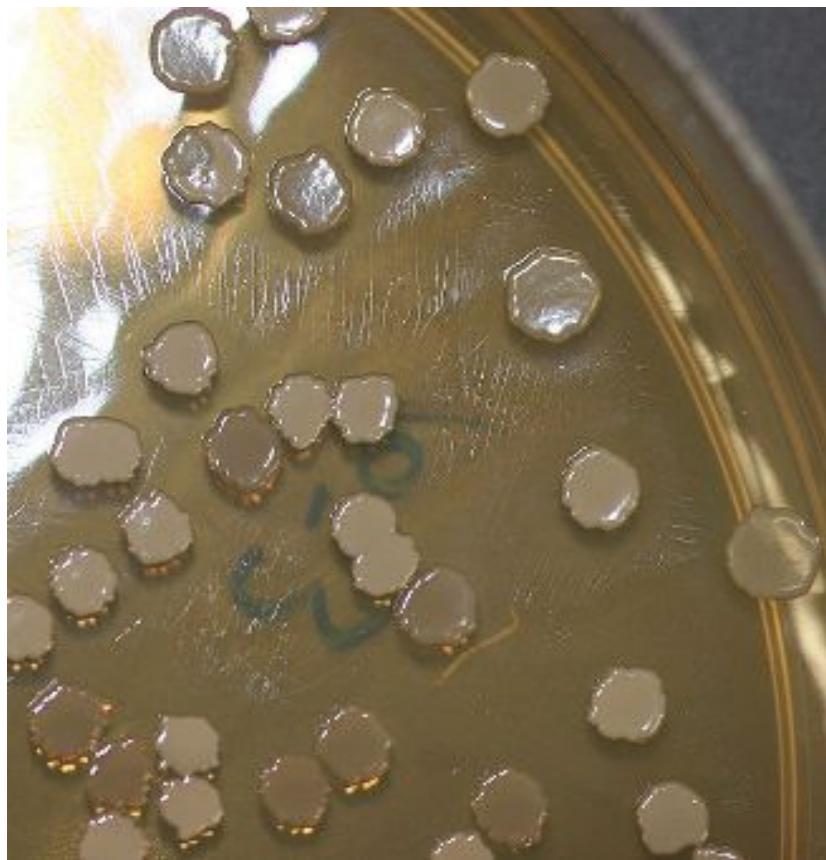
1.1.2 Delovne hipoteze

- izolirali bomo izbrane označevalne gene (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy in nprB*)
- izoliranim genom bomo določili zaporedja nukleotidov DNA
- v zaporedjih nukleotidov DNA bomo našli razlike med našim sevom in tipskim sevom

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O BAKTERIJI *Bacillus subtilis*

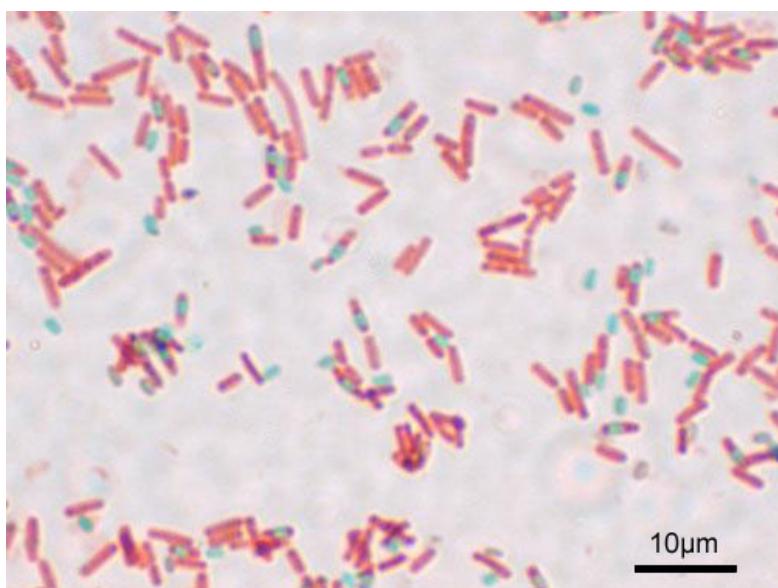
Bacillus subtilis so nepatogeni po Gramu pozitivni bacili, merijo v dolžino od 0,5 do 1 μm . So aerobi, oziroma fakultativni anaerobi, katere pogosto najdemo v zemlji.



Slika 1: Prikaz kolonij bakterij *Bacillus subtilis* (Wikipedia, 2009)

Aerobne sporotvorne bakterije so raznoliki kemoheterotrofi, sposobni rasti na različnih enostavnih organskih spojinah (sladkorji, amino kisline, organske kisline). V nekaterih primerih lahko tudi fermentirajo ogljikove hidrate. Nekaj vrst bakterij iz rodu *Bacillus* (npr. *Bacillus megaterium*) ne potrebuje nikakršnih organskih rastnih faktorjev; drugi spet potrebujejo amino kisline, vitamine B kompleksa ali oboje. Večina bakterij iz rodu *Bacillus* je mezofilnih, s temperaturnim optimumom med 30 in 45 °C, lahko pa so tudi

termofilni s temperaturnim optimumom do 65 °C, ali celo psihrofili, sposobni rasti in sporulacije pri 0 °C. So neutrofili, vendar pa lahko rastejo na širokem območju vrednosti pH – od 2 do 11. Sposobni so tvorbe trpežne endospore (Slika 2, zeleno), katere naloga je zaščita pred negativnimi okoljskimi vplivi, kot so na primer toplota, kislost, slanost. Spore lahko preživijo v neugodnih razmerah zelo dolgo časa. Tvorijo se v obdobju stresa, ko je bakterija brez hrani. Tako je organizmu omogočen obstoj, dokler se okoljske razmere ne izboljšajo (lahko tudi vrsto let). Ob ugodnih razmerah se hitro razmnožujejo z delitvijo (Todar, 2009).



Slika 2: *Bacillus. subtilis* med sporulacijo (Wikipedia, 2009)

Genom bakterije *B. subtilis* je sestavljen iz 4.214.810 baznih parov, kateri kodirajo zapise za 4.100 proteinov, od tega jih je 53 % zastopanih po enkrat, ostali pa spadajo v številne genske družine, kjer so geni za določene proteine podvojeni (Kunst in sod., 1997).

B. subtilis uporabljajo kot dodatek k zemlji, da bi vzpodbudili rast rastlin, v hortikulturi in agrikulturi. Ker *B. subtilis* proizvaja številne encime, ga na široko uporabljajo kot dodatek v pralnih praških. Prav tako ga uporabljajo v alternativni medicini kot imunostimulativno sredstvo pri boleznih prebavil in sečil. Je modelni organizem za raziskave po Gramu pozitivnih bakterij. Ker *B. subtilis* izloča veliko industrijsko pomembnih hidroliznih encimov, antibiotike, surfaktante in snovi za razgradnjo ksenobiotikov, ga pogosto

uporabljamo v tradicionalnih in industrijskih fermentacijskih procesih. V kmetijstvu ga uporabljamo kot dodatek h krmil živali, saj imajo izbrani sevi tudi probiotične značilnosti (Wikipedia, 2009).

2.2 *Bacillus subtilis* KOT PROBIOTIK

Probiotiki so definirani kot nepatogeni mikroorganizmi, ki ob zaužitju ugodno vplivajo na zdravje ali fiziologijo gostitelja. Sestavlajo jih glive ali bakterije, še posebej mlečnokislinske bakterije. Njihova usoda in učinki v prebavnem traktu se razlikujejo med sevi (Marteau in sod., 2001). Obstajata dva mehanizma delovanja probiotikov:

- vnos koristne mikroflore v prebavila:
 - sinteza encimov (boljša prebavljivost krme, razgradnja neželenih snovi (npr. enterotoksinov))
 - presnovni produkti (stimulacija zorenja črevesnih resic, tvorba vitaminov...)
- zaviranje neželenih bakterij v prebavilih
 - tekmovanje za hranila
 - konkurenca za prostor
 - sinteza baktericidnih/bakteriostatičnih snovi

(Avguštin, 2006)

V kmetijstvu uporablja probiotike kot krmne dodatke. Ti dodatki ugodno vplivajo na gostitelja s tem, da izboljšajo mikrobnno ravnotesje v njegovem prebavnem traktu. Potencialne koristi probiotikov vključujejo izboljšanje rasti ter preprečevanje različnih prebavnih motenj. Proizvodi, ki vsebujejo endospore predstavnikov rodu *Bacillus* (v koncentracijah do 10^9 spor/g, oziroma 10^9 spor/ml) uporablja komercialno kot probiotike, saj jih lahko za razliko od drugih nesporogenih bakterij hranimo v izsušeni obliki za nedoločen čas.

Pri dolgotrajnem uživanju večjih količin spor bakterij iz rodu *Bacillus* se pojavi vprašanje, kaj se zgodi s sporami v prebavnem traktu. Ker ni znanih dokazov o kolonizaciji, je možno, da spore interagirajo z limfnim tkivom v prebavnem traktu. Študije so pokazale, da spore *B. subtilis* kalijo v tankem črevesju. Spore najverjetneje niso samo prehodni

obiskovalci črevesja. Če pa morda so, imajo verjetno bližnjo interakcijo s celicami gostitelja ali mikrofloro, ki lahko poveča njihov potencialni probiotični učinek. Zaužiti probiotiki naj bi imeli pozitiven učinek na gostitelja upoštevajoč tri osnovne mehanizme:

- imunomodulacija (stimulacija limfnega tkiva v črevesju; npr. indukcija citokinov),
- kompetitivna izključitev patogenov v prebavilih (npr. tekmovanje za vezavna mesta) in
- izločanje protimikrobnih substanc, ki preprečijo rast škodljivih bakterij (bakteriocini).

Nekatere študije so pokazale neposreden probiotičen efekt spor *Bacillus*. Preliminarne študije s perutnino pa so pokazale, da obstaja kompetitivna izključitev sevov bakterije *Escherichia coli* z *B. subtilis*., v komercialnem pripravku Biospirinu pa uporabljen sev *Bacillus* proizvaja antibiotik, ki inhibira rast bakterije *Helicobacter pylori*. (Duc in sod., 2004) Encimi probiotikov lahko izboljšajo prebavlјivost hrane in tako gostitelju omogočijo razgradnjo snovi, katere gostitelj s svojim naborom encimov ne bi mogel razgraditi, mikrobnata biomasa pa je lahko pomemben vir proteinov za gostitelja.

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)

laktobacili	bifidobakterije	enterokoki	ostali
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. adolescentis</i>		<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. longum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bif. breve</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bif. lactis</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. gasseri</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			

2.3 MIKROBNI ENCIMI

Mikrobne encime lahko uporabljamo v različne namene: pri diagnostiki in raziskavah, organski sintezi, v prehranski industriji in za hidrolizo bioloških polimerov (polisaharidov in proteinov). Večinoma so ti encimi:

- amilaze – hidroliza 1-4glikozidne vezi; uporablajo jih v pekarstvu, papirni industriji, industriji sladkih sirupov (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*)
- invertaze – razcep saharoze v glukozo in fruktozo; uporablajo jih v slaščičarstvu (*Saccharomyces cerevisiae*)
- glu oksidaza – odstranjevanje glukoze; uporablajo jo pri testnih lističih za diabetike
- glu izomeraze – konvertira D-glukozo v D-fruktozo; uporablajo jih pri proizvodnji pijač (*Bacillus coagulans*, *Streptomyces albus*)
- pektinaze – razgradijo 1,4-anahidrogalakturonske kisline; uporablajo jih pri čiščenju vina (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*)
- renin – hidroliza κ – kazeina; uporabljamo ga pri koagulaciji mleka (*Mucor miehei*, rekombinantna *E.coli*)
- celulaze – razgradnja celuloze, mehčanje tekstila, detergenti
- lipaze – hidroliza estryskih vezi; uporabljamo jih pri proizvodnji detergentov in v mlekarstu (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*)
- laktaze – razgradnja laktoze v glukozo in galaktozo (*Saccharomyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*).
- DNA polimeraze – PCR
- glukoamilaze – eksoamilaza, cepi tudi 1,6 glikozidno vez; uporablajo jo v pivovarstvu (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*).
- pululanaze – cepi 1,6 glikozidno vez v pululanu in amilopektinu; uporablajo jih pri procesiranju škroba (*Klebsiella aerogenes*)
- glukanaze – cepi 1,3 glikozidno vez; uporablajo jo v pivovarstvu (*B. subtilis*, *A. niger*, *P. emersonii*)

- alkalne proteaze – cepitev proteinov v alkalmem, detergenti (*Bacillus licheniformis*)
- nevtralne proteaze – hidroliza peptidne vezi; pekarstvo, čiščenje madežev, mehčanje mesa, detergenti (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*).

(Stopar, 2005a)

2.4 INDUSTRIAL PROIZVODNJA MIKROBNIH ENCIMOV

Uporaba mikrobnih encimov je zelo razširjena, zato je potrebna industrijska (masovna) proizvodnja teh encimov. Proizvajamo jih s pomočjo mikroorganizmov. Ti mikroorganizmi morajo biti varni – imeti morajo status GRAS (generally recognized as safe). To pomeni, da ne smejo biti patogeni ali toksigeni. Mikroorganizme v ta namen gojimo v bioreaktorjih, v tekočih ali pa na trdnih gojiščih. Zaradi ekonomičnosti je potrebno izbrati organizem, ki lahko v čim krajšem času proizvede čim več encima, ob tem pa porabi razmeroma malo hranil, ki naj bi bila čim cenejša. Prav tako pa je pomembno, da so stroški čiščenja encimov čim nižji (Madigan in sod., 2002).

Organizmi proizvajajo veliko število encimov, največkrat v manjših količinah. Te encime organizmi porabijo v celičnih procesih. Nekateri organizmi pa so sposobni proizvajati večje količine določenih encimov. Ti encimi se ne porabijo v celičnih procesih, ampak jih organizmi izločijo v okolje. Takšnim encimom pravimo ekstracelularni encimi. Sposobni so razgradnje netopnih polimerov, kot je na primer celuloza, proteini in škrob. Produkti razgradnje so potem transportirani v celice, kjer jih organizmi porabijo kot hranila za rast. Nekatere ekstracelularne encime uporabljam v prehrambeni, mlekarski, farmacevtski in tekstilni industriji. Pridobivamo jih s pomočjo mikrobne sinteze. Encimi so zelo uporabni biokatalizatorji, ker pogosto reagirajo z eno kemično funkcionalno skupino, sposobni pa so tudi razlikovati med podobnimi funkcionalnimi skupinami znotraj ene molekule (Madigan in sod., 2002).

Encime za komercialno uporabo pridobivamo s pomočjo gliv in bakterij. Mikrobeni encimi, proizvedeni v največjih količinah, so bakterijske proteaze, amilaze, lipaze in reduktaze, katere dodajajo v pralne praške. Večino teh encimov izolirajo iz alkalofilnih bakterij, predvsem bakterij iz rodu *Bacillus*. Ti encimi imajo optimalno vrednost pH med 9 in 10 ter

ostanejo aktivni v alkalnem pH okolju pralnih praškov. Za komercialno uporabo pomembni encimi so tudi amilaze in glukoamilaze, katere uporabljamo za proizvodnjo glukoze iz škroba, nadalje pa lahko takšno glukozo s pomočjo glukozne izomeraze spremenimo v fruktozo. Rezultat so razni sladkorni sirupi iz koruze, žita, ali krompirjevega škroba, ki se na veliko uporablajo v proizvodnji sokov (Madigan in sod., 2002).

Ker organizmi velikokrat ne proizvedejo velikih količin encimov, kakršne bi potrebovali pri industrijski proizvodnji encimov, se poslužujemo različnih tehnik, s katerimi povečamo ekspresijo. Največkrat so to molekularno genetske metode, pri katerih spremenimo določene zapise v zaporedju DNA.

2.5 EKSTRACELULARNI PROTEINI *B. subtilis*

Ekstracelularni encimi so tisti encimi, ki se popolnoma izločijo iz celice in so raztopljeni v gojišču. Sproščanje teh encimov je možno na več načinov. Encimi so lahko vezani na membrano mladih celic in se sprostijo šele, ko celice preidejo v stacionarno fazo, lahko pa jih sprostimo z relativno blagimi postopki, ki vključujejo spiranje celic z vodo ali koncentrirano solno raztopino.

Skupek ekstracelularnih encimov bakterije *B. subtilis* je precejšen. Vključuje agarazo, amilaze, arabinazo, celulazo, hitinazo, dekstranazo, galaktanazo, β -1,3-glukanazo, β -1,6-glukanazo, izoamilazo, lihenazo, maltaze, ksilanaze, vrsto proteaz (metalna proteaza, nevtralna proteaze, serinska proteaza, esteraze...), fosfataz (alkalno fosfatazo). Za veliko večino ekstracelularnih encimov *B. subtilis* je verjetno, da je njihova edina funkcija razgradnja polimerov v okolju in posledično zagotavljanje hranil za bakterijo (Priest, 1977).

2.6 INTELEKTUALNA LASTNINA

Zakonodaja o industrijski lastnini je del širšega področja zakona, poznanega kot intelektualna lastnina. Izraz intelektualna lastnina se nanaša v glavnem na stvaritve človeškega uma. Pravice intelektualne lastnine ščitijo interes kreatorjev tako, da jim daje lastninske pravice za njihove stvaritve.

Konvencija o ustanovitvi Svetovne organizacije za intelektualno lastnino (1967) ne želi opredeliti intelektualne lastnine, vendar predstavlja naslednji seznam stvaritev, ki so zaščitene s pravicami intelektualne lastnine:

- literarna, umetniška in znanstvena dela,
- izvedbe umetnikov, fonograme, oddaje,
- izumi na vseh področjih človeškega prizadevanja,
- znanstvena odkritja,
- industrijski dizajn,
- blagovne znamke, storitvene znamke in trgovska imena ter označbe,
- zaščita pred nelojalno konkurenco in
- »vse druge pravice, ki izvirajo iz intelektualnih dejavnosti na industrijskem, znanstvenem, književnem ali umetniškem področju«.

Intelektualna lastnina se nanaša na posamezne informacije ali znanje, katero lahko vključimo v več izdelkov hkrati v neomejenem številu kopij na različnih mestih povsod po svetu. Lastnina se ne nanaša na kopije, ampak na informacije, oziroma znanje, ki se odraža v njih. Pravice do intelektualne lastnine imajo tudi določene omejitve, kot je na primer omejeno trajanje avtorskih pravic in patentov.

Zakoni za zaščito intelektualne lastnine obstajajo zaradi dveh osnovnih namenov. Prvi je zakonsko zagotoviti moralne in ekonomske pravice avtorjev za njihove stvaritve ter pravico drugim pri uporabi teh stvaritev. Drugi je spodbujanje ustvarjalnosti in razširjanja ter uporaba rezultatov in spodbujanje pravične trgovine, ki bi prispevala h gospodarskemu in k socialnemu razvoju (WIPO, 2009).

2.6.1 Prijava patenta za mikroorganizme

Svetovna organizacija za intelektualno lastnino – WIPO, je specializirana organizacija v okviru Organizacije združenih narodov. Njen namen je pospeševanje varstva intelektualne lastnine s sodelovanjem med državami. Pod njenim okriljem je bilo sprejetih več mednarodnih pogodb, na podlagi katerih so ustanovljene posebne unije. V okviru WIPO delujejo tudi posebne samostojne unije, kot so npr. Pariška, Bernska in Madrikska unija, ki so bile ustanovljene že konec 19. stoletja.

Budimpeštanska pogodba o mednarodnem priznanju depozita mikroorganizmov za postopek patentiranja iz leta 1977 (omogoča državam članicam deponiranje mikroorganizmov za namene patentnega postopka pri katerem koli mednarodnem depozitarnem organu, tudi če ta ni na ozemlju zadevne države. Republika Slovenija je pogodbenica te pogodbe od leta 1998. Budimpeštanska pogodba ima trenutno 62 pogodbenic, ki tvorijo posebno Unijo za mednarodno priznanje depozita mikroorganizmov za postopek patentiranja (Budimpeštanska unija), ki je samostojna unija pod okriljem WIPO (Predloga zakona o ratifikaciji..., 2006).

Shranjene kulture mikroorganizmov se uporabljajo za primerjavo in identifikacijo (tipski sevi, referenčne kulture), raziskovanje, biotehnološke postopke, učenje in izobraževanje ter zaščito patentov. Lahko so dostopne vsakomur ali pa so shranjene kot patentirane in varni ali trajni depozit. Druge naloge mikrobioloških zbirk so izolacija mikroorganizmov iz narave, taksonomska identifikacija in karakterizacija izoliranih sevov, vodenje podatkov o izoliranih kulturah oziroma o kulturah, pridobljenih iz drugih mikrobioloških zbirk ali ustanov, sprotno konzerviranje izoliranih kultur, informiranje o kulturah (lastnih in tistih, ki so shranjene v drugih mikrobioloških zbirkah), posredovanje informacij v katalogu ali elektronski obliki, spremljanje zakonodaje, ki je pomembna pri razpošiljanju kultur, karantenskih predpisih, patogenosti sevov, ipd.

Po Zakonu o zaščiti pravic intelektualne lastnine je treba pred prijavo patenta mikroorganizem deponirati v zbirki, ki ima status IDA (International Depository Authority). Tak sev je nato po določilih na razpolago javnosti. Mednarodne odnose na področju depozitorjev, depozitov in patentnih uradov ureja Budimpeštanska pogodba. Da so izpolnjene zahteve omenjene pogodbe in da postane zbirka priznana kot mednarodna depozitarna avtoriteta (IDA), mora izpolniti več pogojev:

- mora biti v eni od držav podpisnic, ki jo mora tudi priznati;
- imeti mora kontinuirano eksistenco;
- imeti mora ustrezne ljudi in opremo;
- biti mora objektivna in nepristranska;
- biti mora dostopna vsakemu depozitorju na enaki podlagi;
- sprejemati mora določene mikroorganizme, pregledati njihovo viabilnost in jih nato shraniti na genetsko stabilen način za 30 let;
- izdajati mora potrdila o sprejemu mikroorganizmov in njihovi viabilnosti;
- mora se držati dogоворов o tajnosti podatkov;
- preskrbeti mora vzorce v skladu s pravili.

(MOP - ARSO, 2001)

2.6.1.1 Prvotni depozit

K mikroorganizmu, ki ga deponent dostavi mednarodnemu depozitarnemu organu, je, razen kadar gre za ponoven depozit, treba priložiti pisno izjavo s podpisom deponenta, ki vsebuje:

- navedbo, da je deponiranje opravljeno po tej pogodbi, in zavezo, da ga ne bo umaknil v obdobju najmanj pet let po prejemu zadnje zahteve za pošiljanje vzorca deponiranega mikroorganizma, v vsakem primeru pa najmanj 30 let od dneva depozita;
- ime in naslov deponenta;

- podrobnosti o pogojih, potrebnih za gojenje in hrambo mikroorganizma ter preskušanje njegove vitalnosti, pa tudi opise sestavin mešanice, kadar je deponirana mešanica mikroorganizmov, in vsaj ene od metod, ki omogočajo preveritev njihove navzočnosti;
- identifikacijski znak (številko, simbole itd.), ki ga je dal deponent mikroorganizmu;
- podatke o lastnostih mikroorganizma, ki so ali utegnejo biti nevarne za zdravje ali okolje, ali navedbo, da deponentu niso znane take lastnosti.

Močno se priporoča, da pisna izjava vsebuje znanstveni opis in/ali predlagano taksonomsko oznako deponiranega mikroorganizma (Zakon o ratifikaciji..., 1997: 2023-2023)

2.7 ORODJA ZA PREPOZNAVANJE IN SLEDENJE MIKROORGANIZMOV

Za sledenje in prepoznavanje specifičnih vrst oziroma sevov bakterij, uporabljam različna orodja za sledenje. Delimo jih na orodja za kvalitativno in orodja za kvantitativno detekcijo.

Orodja za kvalitativno detekcijo in identifikacijo vključujejo nacepitev sevov na gojišče (tudi selektivno) in ogled kolonij na petrijevkah, identifikacijo zraslih kolonij z osnovnimi testi, kjer opazujemo:

- makrotipske lastnosti (oblika, vonj, hemoliza, gibljivost),
- mikrotipske lastnosti (barvanja, prisotnost kapsul, prisotnost spor, prisotnost in razporeditev flagel, morfologija),
- fiziološke lastnosti (potreba po kisiku, rast pri različni temperaturi, rast pri različnih vrednostih pH),
- biokemijske lastnosti (tip metabolizma, prisotnost encimov, razgradnja določenih substratov do določenih produktov, sposobnost rasti na določenih substratih, profil lahko hlapnih maščobnih kislin),
- kemotaksonomske lastnosti (prisotnost določenih molekul v celični steni, membrani ali v celici),

- antigenske lastnosti (prisotnost specifičnih antigenov),
- genotipske lastnosti (prisotnost različnih sekvenc rRNA, insercijske sekvene, geni za virulenčne dejavnike ali drugi specifični geni).

(Turk in Gostinčar, 2008)

Pomembne tehnike za ločevanje na nivoju vrst in sevov so RFLP, ribotipizacija, pomnoževanje DNA (AFLP, AP-PCR, rep-PCR, RAPD, ARDRA), fagotipizacija, serologija, cimologija, elektroforeza vseh proteinov (2D elektroforeza), DNA-DNA hibridizacija, fiziološki testi (Biolog, API)... Dostopnih je več vrst komercialnih testov, ki omogočajo hitro identifikacijo mikroorganizmov – Rapid ANA, Rapid One, MicroResp, MicroID, VITEK, BBL Crystal, Riboprinter in drugi (Stopar, 2005b).

Z orodji za kvantitativno detekcijo lahko preverjamo ustreznost komercialnih pripravkov. Če želimo določiti, koliko je našega seva v komercialnem izdelku, lahko izvedemo kvantitativni PCR (qPCR) in s pomočjo umeritvenih krivulj določimo količino seva. S kvantitativnim PCR lahko tudi diferencialno ločujemo bakterije istih rodov med seboj. Uveljavljeni sta predvsem dve različici kvantitativnega PCR. Kompetitivni PCR in PCR v realnem času. Kompetitivni PCR je metoda, pri kateri dodamo tarčni nukleinski kislini v reakcijsko mešanico kompetitorsko nukleinsko kislino, ki službi kot interni standard reakcije. Z uporabo tega standarda se izognemo težavam zaradi variabilnosti v pomnoževanju DNA med ločenimi reakcijami. Interna kontrola je izdelana tako, da ohrani prepoznavni mesti za začetna oligonukleotida in v reakciji tekmuje za reagente (kompeticija) s tarčno DNA. Ločevanja od PCR pomnožkov tarčne DNA omogoči razlika v dolžini obeh pomnožkov. Z merjenjem količine nastalih pomnožkov in umeritveno krivuljo, pripravljeno z zanimi količinami DNA, lahko izračunamo količino DNA v preiskovanem vzorcu (Zachar in sod., 1993). Verižna reakcija s polimerazo v realnem času pa temelji na sprotnem spremmljanju poteka reakcije. Nastajanje produkta se spreminja preko fluorescentnega reporterja.

Ta metoda je, v kolikor nimamo lastne aparature, relativno draga. Zato za rutinske analize uporabljamo metodo določanja kolonijskih enot (KE), ki je precej zahtevna, še posebej v krmnih mešanicah. Poleg tega pa je pri krmnih mešanicah tudi bistvena razlika med KE in dejanskim številom mikroorganizmov na gram materiala.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Pri izvajanju poskusov smo uporabili naslednje kemikalije (v oklepaju je naveden proizvajalec):

- agar (Sigma)
- agaroza (Sigma)
- ampicilin
- borova kislina
- CaCl₂ x 2 H₂O (Sigma)
- CTAB, cetil trimetilamonijev bromid
- EDTA, etilendiamin-tetraacetat (Sigma)
- etanol
- Glicerol (Acros)
- glukoza (Sigma)
- IPTG, izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
- izopropanol (Acros)
- lizocim
- KCl (Sigma)
- kongo rdeče (Sigma)
- ksilan ovsenih plev (Sigma)
- kvasni ekstrakt (Sigma)
- bakteriofag λ , rezan z encimoma EcoRI in HindIII
- bakteriofag λ , rezan z encimom PstI
- NaCl (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- proteinaza K
- RNAza A
- SDS, natrijev dodecil sulfat

- SYBR Safe DNA barvilo
- Tripton (Fluka)
- TRIS baza (Sigma)
- Tris Cl
- Tris-HCl (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- X-gal, bromo-kloro-indolil-galaktopiranozid

3.1.2 Bakterijski sevi

Izbrani sev *Bacillus subtilis* – KBL 001 (CBS117162) se nahaja v zbirki Krke, d.d., na oddelku za Biokemijo, uporabili smo tudi *E.coli* TOP10 ter *E.coli* JM109.

3.1.3 Izbrani geni

Preglednica 2: Izbrani geni bakterije *Bacillus subtilis*, katere smo želeli izolirati

Izbrani gen	Protein, katerega gen kodira
<i>amyE</i>	α - amilaza
<i>xynD</i>	endo-1,4- β -ksilanaza (ksilanaza D)
<i>xynA</i>	endo-1,4- β -ksilanaza
<i>aprE</i>	subtilizin E (serinska alkalna proteaza)
<i>phoA</i>	alkalna fosfataza A
<i>phoB</i>	alkalna fosfataza III
<i>nprE</i>	ekstracelularna nevtralna metaloproteaza (bacitolizin)
<i>licH</i>	6-phosfo- β -glukozidaza
<i>phy</i>	fitaza
<i>nprB</i>	ekstracelularna nevtralna proteaza

3.1.4 Sestava gojišč

Luria Bertanijevi gojišče (LB)

kvasni ekstrakt	0,5 %
tripton	1 %
NaCl	1 %

Za pripravo 1 l tekočega gojišča vse sestavine najprej raztopimo v 900 ml vode in šele nato dopolnimo do 1000 ml. Avtoklaviramo in ohladimo. Gojišče je tekoče do približno 50 °C.

Za pripravo trdnega gojišča – plošč moramo sestavinam pred raztopljanjem dodati še 15 g/l agarja.

SOC

tripton	2g
kvasni ekstrakt	0,5g
NaCl (1M)	1mL
KCl (1M)	0,25 mL

Za pripravo 100 mL tekočega gojišča najprej zatehtamo tripton in kvasni ekstrakt, nato dodamo NaCl in KCl. Šele nato dodamo 97 mL destilirane vode in avtoklaviramo. Med sterilizacijo pripravimo 2M glukozo in jo sterilno prefiltriramo. Po sterilizaciji v gojišče sterilno dodamo 1mL glukoze.

LB + Amp + IPTG + X-gal

Pripravimo raztopino za trdno gojišče LB, steriliziramo in ohladimo do približno 50 °C. Šele ko je gojišče ohlajeno, lahko dodamo antibiotike. V ohlajeno gojišče dodamo ampicilin (koncentracija v gojišču 100 µg/mL), IPTG (koncentracija v gojišču 0,5 mM) in X-gal (koncentracija v gojišču 80 µg/mL).

3.1.5 Priprava pufrov in drugih raztopin

Pufre in raztopine smo pripravili tako, da smo suhe snovi zatehtali in jih prenesli v čašo s polovico končnega volumna destilirane vode. Ko so se vse snovi raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dopolnili z vodo do ustreznega volumna. Če smo morali raztopini izmeriti pH, smo to storili, ko so bile vse sestavine raztopljene in preden smo dopolnili z vodo do ustreznega volumna.

Pufer TBE (5x)

Baza Tris	54 g
Borova kislina	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL

Dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL. Hranimo pri 4 °C. Pred uporabo smo pufer 10x redčili z destilirano vodo.

0,5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	93,6 mg
dH ₂ O do 500 mL	

z 10 mM NaOH uravnamo pH na 8.0. Hranimo pri sobni temperaturi.

Proteinaza K

Proteinaza K	10 mg
sterilna ddH ₂ O	1,0 mL
Hranimo pri -20°C.	

Lizocim (20 mg/mL)

Lizocim	20 mg
sterilna ddH ₂ O	1,9 mL
Hranimo pri -20 °C.	

Ampicilin (100 mg/mL)

Ampicilin - 100 mg
dH₂O 1 mL

Steriliziramo s filtracijo skozi filter s premerom por 0,22 µm. Hranimo pri -20 °C.

5% CTAB

CTAB 5 g
H₂O 100 mL

Raztopimo v vodi ob segrevanju do 65 °C in mešanju

CTAB/NaCl

NaCl 4,1 g
CTAB 10 g
dH₂O 100 mL

NaCl raztopimo v 80 mL destilirane vode. Nato med počasnim segrevanjem do 65 °C počasi dodamo 10 g CTAB. Z vodo dopolnimo do 100 mL.

STET (saharoza, tris, EDTA, triton)

NaCl 0,1 M
Tris Cl (pH 8,0) 10 mM
EDTA (pH 8,0) 1 mM
Triton X-100 5 %

Sestavine raztopimo v vodi in avtoklaviramo

RNAza (založna raztopina)

RNAzo A raztopimo do končne koncentracije 10 mg/mL v 10 mM TrisCl (pH 7,5) in 15 mM NaCl. Inkubiramo 15 minut pri 100 °C. Pustimo, da se počasi ohladi do sobne temperature in jo razdelimo v alikvote ter shranimo pri -20 °C. Za uporabo jo redčimo s pufom TE do končne koncentracije 50 µg/mL.

Pufer TE

Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM

EDTA (pH 8,0) 1 mM

Raztopino avtoklaviramo

10 % SDS

SDS raztopimo v vodi. Ne avtoklaviramo.

Fenol/kloroform/izoamilalkohol

Mešanico pripravimo v razmerju 25:24:1. Kot antioksidacijsko sredstvo fenola dodamo hidroksikinolin. Po premešanju mešanico centrifugiramo 30 minut pri 4000 obratih/minuto.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava kompetentnih celic

Bakterijsko kulturo *E.coli* JM109 smo inkubirali pri 37 °C do koncentracije 10^8 celic/mL, kar je bilo približno 3 ure. Štiriinrideset mL kulture smo prenesli v ohlajeno centrifugirko in inkubirali 10 minut na ledu. Centrifugirali smo 10 minut pri 10.000 obratih/minuto in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili v odlagalki, z avtomatsko pipeto smo odstranili ostanek supernatanta. Bakterijske celice smo resuspendirali v 7 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂ ter inkubirali 10 minut na ledu. Centrifugirali smo 10 minut pri 10.000 obratih/minuto in 4 °C. Odlili smo supernatant in odstranili ostanek supernatanta s pipeto. Bakterijske celice smo resuspendirali v 1,4 mL ledeno hladne raztopine CaCl₂. Po 200 µL kompetentnih celic smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in jim dodali 46 µL 87 % glicerola, rahlo premešali in celice do uporabe shranili pri -80 °C.

3.2.2 Elektroforeza

- z uporabo SYBR Safe DNA barvila in Safe Imager Blue Light transiluminatorja
Pri elektroforezi smo uporabljali 1 % agarozni gel. Zatehtali smo 5 g agaroze in dodali 50 mL 0,5X TBE pufra. Erlenmajerico s pufrom in agarozo smo dali v mikrovalovno pečico in jo segrevali toliko časa, da se je agariza raztopila. Nato smo počakali, da se je vsebina ohladila. Ohlajeni agarazi smo dodali 1 µL SYBR Safe DNA barvila in premešali. Gel smo razlili v nosilec za gel s primernim glavnikom in počakali, da je polimeriziral. Gel smo postavili v elektroforetsko banjico in ga prelili z 0,5X TBE pufrom tako, da je bil gel prelit. Na parafilm smo nanesli kapljico barvila in jo pomešali z vzorcem DNA. Mešanico vzorca in barvila smo nanesli v jamico agaroznega gela. V prvo in zadnjo jamico smo vnesli DNA bakteriofaga λ, cepljenega z EcoRI/HindIII ali PstI. Elektroforetsko banjico smo priključili v električno polje ustrezne jakosti. Po končani elektroforezi smo gel prenesli na Safe Imager Blue Light transiluminator in ga fotografirali.

- z uporabo etidijevega bromida in UV transiluminatorja

Pri elektroforezi smo uporabljali 1 % agarozni gel. Zatehtali smo 5 g agaroze in dodali 50 mL mL 0,5X TBE pufra. Erlenmajerico s pufrom in agarozo smo dali v mikrovalovno pečico in jo segrevali toliko časa, da se je agariza raztopila. Nato smo počakali, da se je vsebina ohladila. Gel smo razlili v nosilec za gel s primernim glavnikom in počakali, da je polimeriziral. Gel smo postavili v elektroforetsko banjico in ga prelili z 0,5X TBE pufrom. Na parafilm smo nanesli kapljico barvila in jo pomešali z vzorcem DNA. Mešanico vzorca in barvila smo nanesli v jamico agaroznega gela. V prvo in zadnjo jamico smo vnesli bakteriofag λ , cepljenega z EcoRI/HindIII. Elektroforetsko banjico smo priključili v električno polje ustrezne jakosti. Po končani elektroforezi smo gel prenesli na UV transiluminator in ga fotografirali.

3.2.3 Transformacija

Mikrocentrifugirke z 200 μL kompetentnih celic smo odtajali pri sobni temperaturi in nato prenesli 100 μL iz vsake mikrocentrifugirke v novo sterilno mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke smo inkubirali 1-2 minuti na ledu. Dodali smo 1 μL izbrane plazmidne DNA in inkubirali 30 minut na ledu. Mikrocentrifugirko s celicami in DNA smo za 90 sekund prenesli v vodno kopel pri 42 °C. Mikrocentrifugirko smo takoj prenesli na led in inkubirali 1-2 minuti. Dodali smo 400 μL gojišča LB (ali SOC) in inkubirali 60 minut s stresanjem pri 37 °C. Po 100 μL transformirane bakterijske kulture smo razmazali na gojišče LB + Amp. Preostalo transformacijsko mešanico smo centrifugirali 1 minuto pri 13.000 obratih/minuto, odlili supernatant in oborino resuspendirali v 100 μL gojišče LB (ali SOC) ter razmazali na drugo gojišče LB + Amp. Na zraslih ploščah smo izbrali transformanto in jo nacepili v tekoče gojišče LB z ampicilinom. Po 24-urni inkubaciji smo namnožene celice alikvotirali v 10 mikrocentrifugirk, jim dodali glicerol, skrbno označili in jih shranili na -80 °C.

3.2.4 Izolacija plazmidne DNA

Izolacija plazmidne DNA z alkalno lizo

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 1,5 mL kulture izbranega seva ter centrifugirali 2 minuti. Odlili smo supernatant in vorteksirali pelet, dokler nismo dobili homogene paste celic. Dodali smo 200 µL raztopine lizocima (GET [50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0] + lizocim [5 mg/mL]), rahlo premešali in inkubirali 5 minut na ledu. Nato smo dodali 400 µL sveže pripravljene raztopine NaOH-SDS in rahlo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Raztopina postane prosojna, ko celice lizirajo. Zopet smo inkubirali 5 minut na ledu. V mikrocentrifugirke smo dodali 300 µL raztopine kalijevega acetata (60 mL 5M kalijevega acetata, 28,5 mL ledocetne kisline, 11,5 mL vode) in rahlo premešali. V mikrocentrifugirkah se tvori precipitat. Mikrocentrifugirke smo nato centrifugirali 10 minut pri 12.000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo pazljivo odstranili 750 µL supernatanta in ga prenesli v čisto in označeno mikrocentrifugirko. Dodali smo 450 µL izopropanola in dobro premešali na mešalu. Zopet smo centrifugirali 10 minut in nato odlili supernatant. Vsebino mikrocentrifugirke smo rahlo sprali s 400 µL mrzlega 70 % etanola in rahlo premešali s 5-kratnim obračanjem mikrocentrifugirke. Nato smo odlili etanol in centrifugirali 30 sekund. Preostalo tekočino smo odstranili s pipeto. Oborino plazmidne DNA smo osušili v odprti mikrocentrifugirki. Pelet smo raztopili v 20 µL Mili-Q vode in shranili na -20 °C.

Izolacija plazmidne DNA s kitom GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 1,5 mL kulture izbranega seva ter centrifugirali 2 minuti pri sobni temperaturi. Odlili smo supernatant in s pipeto odstranili vse preostalo gojišče. Pelet smo s pomočjo pipete in mešala resuspendirali v 250 µL »raztopine za resuspendiranje«. Suspenzijo celic smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirkam smo dodali 250 µL »raztopine za lizo« in premešali z obračanjem mikrocentrifugirke, dokler raztopina ni postala viskozna in rahlo prosojna. Nato smo dodali 350 µL »raztopine za nevtralizacijo« in takoj premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Vzorce smo centrifugirali 5 minut. Supernatant smo prenesli v priloženo GeneJet™ kolono. Pri tem smo pazili, da nismo prenesli belega precipitata.

Kolone z vzorci smo centrifugirali 1 minuto. Tekočino, ki je stekla skozi kolono, smo zavrgli, kolono pa vstavili nazaj v priloženo zbirno mikrocentrifugirko. V kolono smo odpipetirali 500 µL »raztopine za spiranje«. Centrifugirali smo 60 sekund in zavrgli tekočino, ki je stekla skozi kolono. Kolono smo zopet vstavili nazaj v zbirno mikrocentrifugirko. Nato smo zopet dodali 500 µL »raztopine za spiranje«. Centrifugirali smo 60 sekund in zavrgli tekočino, ki je stekla skozi kolono. Kolono smo vstavili nazaj v zbirno mikrocentrifugirko in centrifugirali še dodatno 1 minuto, da smo odstranili preostalo »raztopino za spiranje«. Kolono smo nato prenesli v čisto 1,5 mL mikrocentrifugirko in v sredino membrane GeneJet™ kolone odpipetirali 50 µL »pufra za izpiranje«. Najprej smo inkubirali pri sobni temperaturi 2 minuti, nato pa smo vzorce centrifugirali 2 minuti. Kolono smo zavrgli, izolirano plazmidno DNA pa smo shranili na -20 °C.

3.2.5 Izolacija kromosomske DNA

Centrifugirali smo 1,5 mL bakterijske kulture *B.subtilis* KBL 001 in jo sprali z 0,3 % NaCl. Kulturo smo za 14 dni shranili v zamrzovalniku. Mikrocentrifugirkam smo dodali 567 µL pufra TE z lizocimom (1 mg/mL), suspendirali in suspenziji dodali 30 µL 10 % SDS in 3 µL proteinaze K (20 mg/mL). Mikrocentrifugirke smo inkubirali 1 uro pri 45 °C. Po inkubaciji smo suspenziji dodali 100 µL 5M NaCl in močno premešali. Dodali smo še 80 µL CTAB/NaCl ter inkubirali 10 minut pri 65 °C. Mešanici smo dodali enak volumen kloroforma/fenola/izoamilalkohola, premešali in ponovno centrifugirali 5 minut. Vodno fazo smo prenesli v mikrocentrifugirke. Kromosomska DNA smo oborili z 0,6-kratnim volumnom izopropanola. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 10 minut pri 13.000 rpm. Supernatant smo odlili in oborini dodali 1 mL 80 % etanola. Mikrocentrifugirke smo premešali ter centrifugirali 5 minut pri 13.000 rpm. Ves etanol smo odstranili in oborino osušili do suhega. Izolirani kromosomski DNA smo dodali 25 µL pufra TE z RNAzo. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo. Po izbiri najboljšega vzorca smo le-tega razredčili z dodatkom 200 µL sterilne dH₂O. Vzorec smo alikvotirali v mikrocentrifugirke – po 20 µL – in jih shranili do uporabe na -20 °C.

3.2.6 Čiščenje plazmidne DNA z uporabo kompleta GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

Plazmidni DNA, izolirani s postopkom izolacije plazmidne DNA z alkalno lizo, smo dodali 1:1 volumna »vezavnega pufra« in močno premešali. Mešanico smo prenesli v GeneJET™ kolono in centrifugirali 60 sekund. Tekočino smo odlili iz zbirnika in v kolono dodali 700 µL »raztopine za spiranje« in centrifugirali 60 sekund. Tekočino smo odlili, dodatno centrifugirali 60 sekund, da smo odstranili vso raztopino za spiranje. Kolono smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in v kolono dodali 50 µL »tekočine za izpiranje« in centrifugirali 60 sekund. Kolono smo zavrgli, vzorce pa smo shranili na -20 °C.

3.2.7 PCR

Pripravili smo PCR zmes iz:

25x 0,5 µL dNTP (10 mM)

25x 2,5 µL 10x pufer za Taq polimerazo

1x 10 µL kromosomske DNA

25x 0,125 µL Taq polimeraze

1x 511,875 µL ds H₂O

600 µL

V mikrocentrifugirke z volumnom 200 µL smo prenesli po 24 µL zmesi za PCR ter po 0,5 µL začetnih oligonukleotidov 1 in 2 (smiselni in protismiselni). Mikrocentrifugirke z reakcijskimi zmesmi smo prenesli v aparat za PCR in nastavili program:

Postopek 1

94°C	4 minute	1x
94°C	1,5 minut	
50°C	1,5 minut	30x
<u>72°C</u>	<u>2 minuti</u>	
72°C	5 minut	1x

Postopek 2

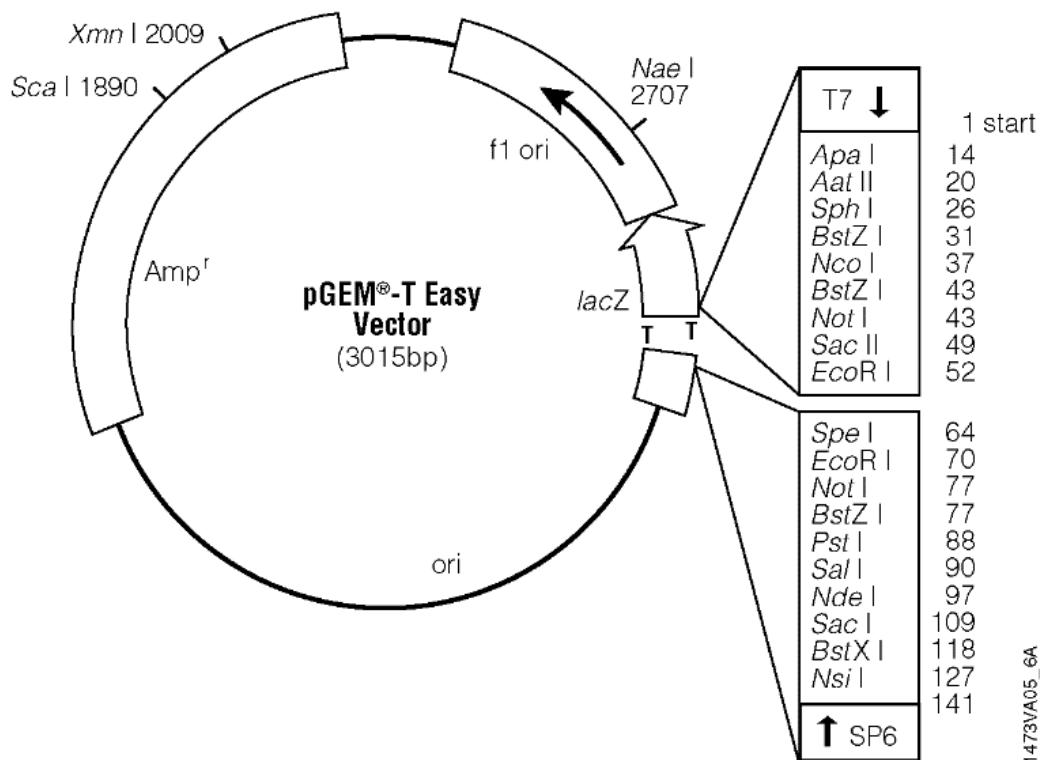
94°C	4 minute	1x
94°C	1,5 minut	
45°C	1,5 minut	30x
<u>72°C</u>	<u>2 minuti</u>	
72°C	5 minut	1x

Postopek 3

94°C	4 minute	1x
94°C	1,5 minut	
40°C	1,5 minut	30x
<u>72°C</u>	<u>2 minuti</u>	
72°C	5 minut	1x

3.2.8 Ligacija z uporabo sistema pGEM-T Easy Vector

Pri ligaciji smo uporabili pGEM[®] - T Easy Vector.



Slika 3: pGEM[®] - T Easy Vector (Promega, 2009)

Mikrocentrifugirko z vektorjem pGEM-T Easy smo centrifugirali. Vmes smo pripravili 8 0,5 mL mikrocentrifugirk za 8 izbranih produktov PCR.

Preglednica 3: Poimenovanje obravnavanih genov bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001

vzorec	poimenovanje vzorca
<i>aprE</i>	3
<i>aprEl</i>	4
<i>phoA1</i>	5
<i>xynD2</i>	10
<i>nprE2</i>	11
<i>nprE4</i>	12
<i>nprB</i>	13
<i>xynA5</i>	19

V eno 1,5 mL mikrocentrifugirko smo prenesli 50 µL pufra (T4 DNA Ligase 10x buffer) in pufere alikvotirali v pripravljene 0,5 mL mikrocentrifugirke (po 5 µL v vsako mikrocentrifugirko). V vsako mikrocentrifugirko smo dodali še 1 µL vektorja pGEM-T Easy, 1 µL T4 DNA Ligase in po 3 µL izbranega PCR produkta. Zmesi smo premešali s pipetiranjem. Mikrocentrifugirke smo shranili do uporabe v hladilniku na 4 °C.

3.2.9 Izbera začetnih oligonukleotidov

Za 10 izbranih genov, prikazanih v preglednici 1, smo s pomočjo programa Vector NTI™ (Vector NTI™, 2007) izbrali začetne oligonukleotide. Pri tem smo upoštevali, da so morali biti začetni oligonukleotidi zunaj izbranega zaporedja gena, da je bilo razmerje % GC čim bližje 50 % in dolžina izbranih oligonukleotidov čim bližje 20 AK (med 18 in 23).

Pri Invitrogenu smo naročili izdelavo naslednjih začetnih oligonukleotidov:

Preglednica 4: Izbrani začetni oligonukleotidi

oznaka začetnega oligonukleotida	zaporedje začetnega oligonukleotida	dolžina začetnega oligonukleotida	dolžina produkta PCR
AMYE1S	GGTTATGCTTGGAGAAGGGGTCG	23 AK	3377 BP
AMYE1AS	CGGTTGTAGCCCAAACGCC	19 AK	
AMYE3S	CAACTGTGTGAACCCGACATCC	22 AK	3353 BP
AMYE3AS	CGGTTGTAGCCCAAACGCC	19 AK	
PHOBS	ATGTCCGGTCATCAGTTACCTGG	23 AK	1856 BP
PHOBAS	CCTATCCACGGCCAGTATCTAT	22 AK	
PHOB6S	CATCTGTGCTGTCCTTCTGG	20 AK	1817 BP
PHOB6AS	CCTATCCACGGCCAGTATCT	20 AK	
PHOA1S	GTACGACGGAAAAGGTGTTCAACC	23 AK	1676 BP
PHOA1AS	GGAGAGCTGTGGTTATCCGC	20 AK	
PHOA10S	TAAGCATGCGGGTAAATGGCGG	22 AK	1884 BP
PHOA10AS	GGAGAGCTGTGGTTATCCGC	20 AK	
APRES	CTGAGGCCAGGTTGATCCTCC	20 AK	1324 BP
APREAS	GGAGAGGGTAAAGAGTGAGAACG	23 AK	
APRE1S	CATCCGTCGATCATGGAACG	20 AK	1276 BP
APRE1AS	GGAGAGGGTAAAGAGTGAGAACG	23 AK	
NPRBS	ACTGGCATATGGAGCAGG	18 AK	2017 BP
NPRBAS	CCGTCGGGATTAGCTACGC	19 AK	
NPRB5S	ACTGGCATATGGAGCAGG	18 AK	1982 BP
NPRB5AS	GCCACGGATATGAAACACCT	20 AK	

se nadaljuje...

nadaljevanje Preglednica 4: Izbrani začetni oligonukleotidi

oznaka začetnega oligonukleotida	zaporedje začetnega oligonukleotida	dolžina začetnega oligonukleotida	dolžina produkta PCR
NPRE2S	CACATAGCCACGTGACCTGTAGC	23 AK	2175 BP
NPRE2AS	CGCCAGAACAAACAATTGACC	20 AK	
NPRE4S	CACGTGACCTGTAGCAGAATTG	23 AK	2167 BP
NPRE4AS	CGCCAGAACAAACAATTGACC	20 AK	
XYNDS	GTGCTGGCCCGTACTTCACC	20 AK	1673 BP
XYNDAS	CGTGCAATCTTGTGACCTG	20 AK	
XYND2S	GGTGCTGGCCCGTACTTCAC	20 AK	1674 BP
XYND2AS	CGTGCAATCTTGTGACCTG	20 AK	
XYNA5S	ATGGAGAATAACCTACCTCCAGC	23 AK	890 BP
XYNA5AS	GGACGATCAAAAGCTTGGC	20 AK	
XYNA6S	TGGAGAATAACCTACCTCCAGC	22 AK	889 BP
XYNA6AS	GGACGATCAAAAGCTTGGC	20 AK	
PHYS	GCCAATTATAAAGAGAGACCGTACC	23 AK	1327 BP
PHYAS	AGTGATAAAAGAGAGGAGGGTACCA	23 AK	
PHY2S	GTCGTCAGCACATGGGTTCC	20 AK	1969 BP
PHY2AS	GGCTTATCCTCCAACCTCTCG	20 AK	
LICH5	CGTAACACCGATGCTGAACG	20 AK	1997 BP
LICH6S	GAGGAAACGGTAGGAGCTCC	20 AK	
LICH1S	TGCAATGGTCTATCACTAC	19 AK	2899 BP
LICH1AS	CACAGTGACACTCACGTACATCG	23 AK	

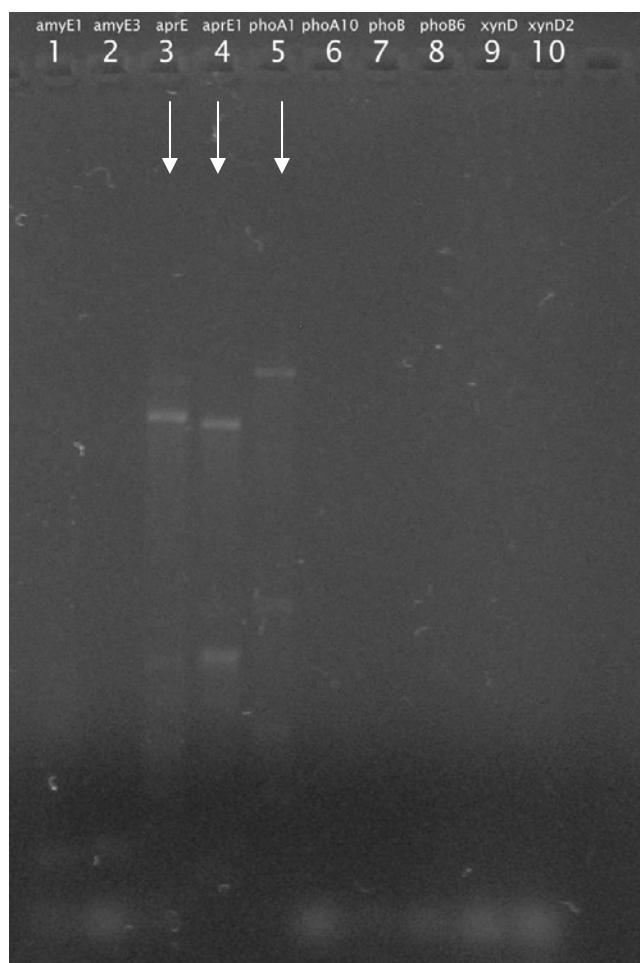
4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA KROMOSOMSKE DNA

Izolacija kromosomske DNA iz bakterije *Bacillus subtilis* – KBL 001 (CBS117162) je bila uspešna.

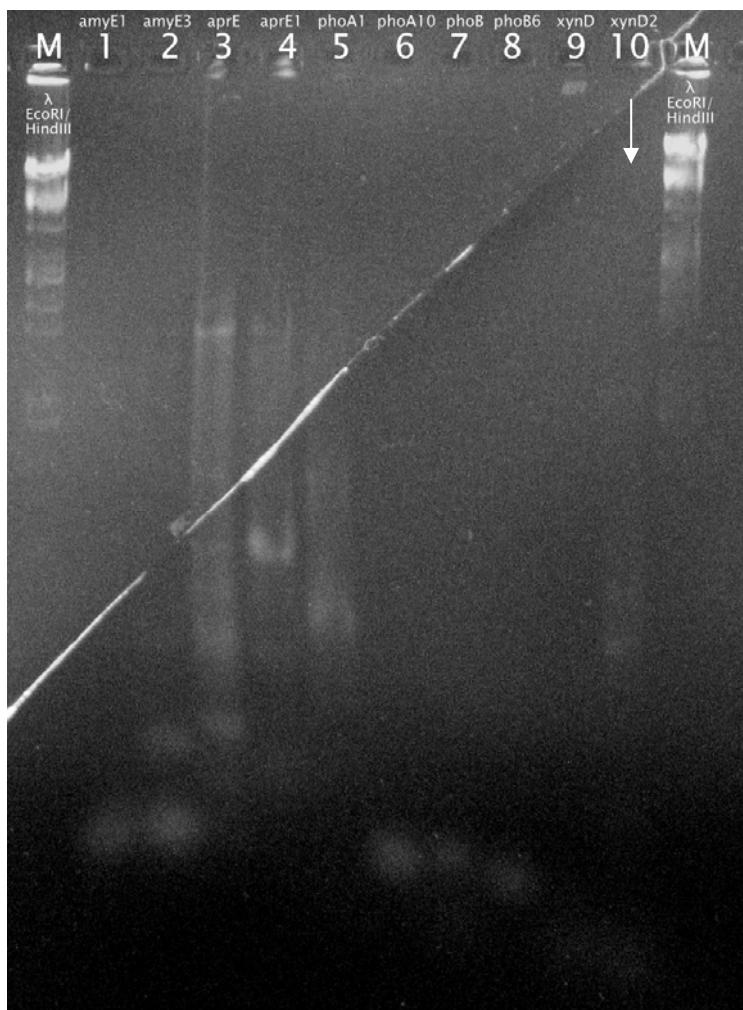
4.2 PCR

Po izolaciji kromosomske DNA iz bakterije *Bacillus subtilis* – KBL 001 (CBS117162) smo izvedli reakcijo PCR. Reakcija je bila uspešna pri vzorcih 3 (*aprE*), 4 (*aprE1*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*). Izbrani vzorci so označeni s puščico.

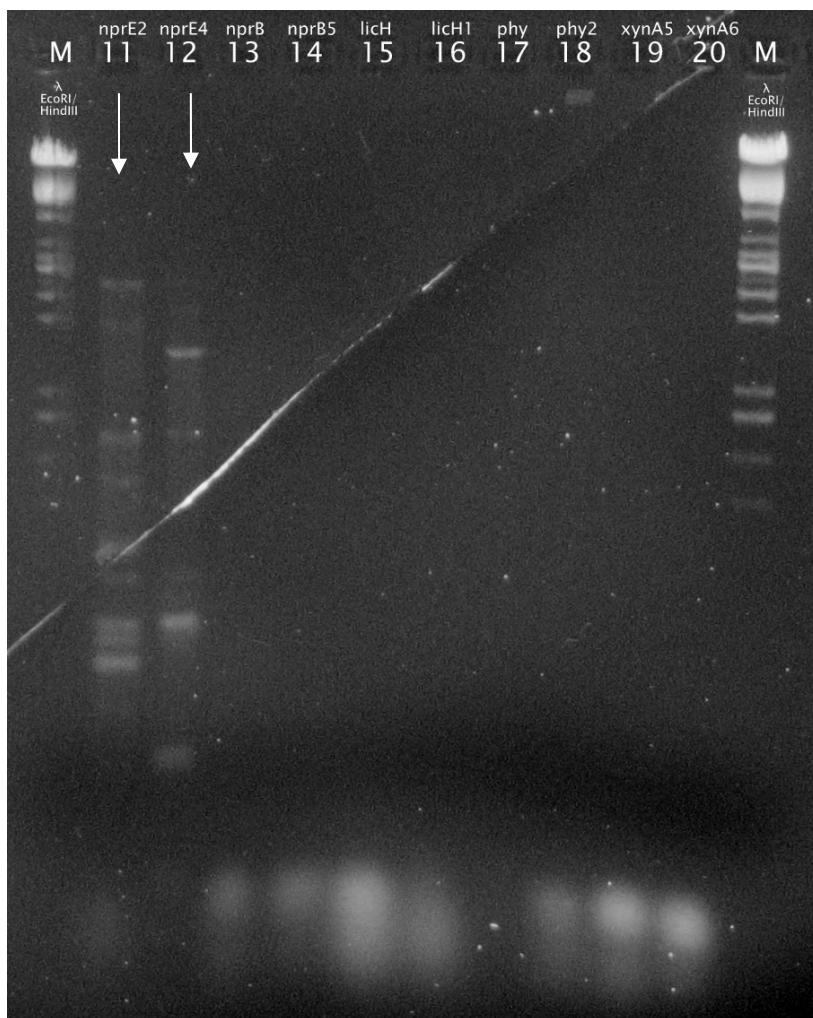


Slika 4: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 1 (vzorci 1-10)

Slika 4 prikazuje gel po izvedeni elektroforezi na 1 % agaroznem gelu. Na gel smo naložili vzorce, ki so bili rezultat PCR reakcije po Postopek 1 (temperatura naleganja 50 °C). Pozitiven rezultat smo opazili le pri vzorcih 3 (*aprE*), 4 (*aprE1*) in 5 (*phoA1*).

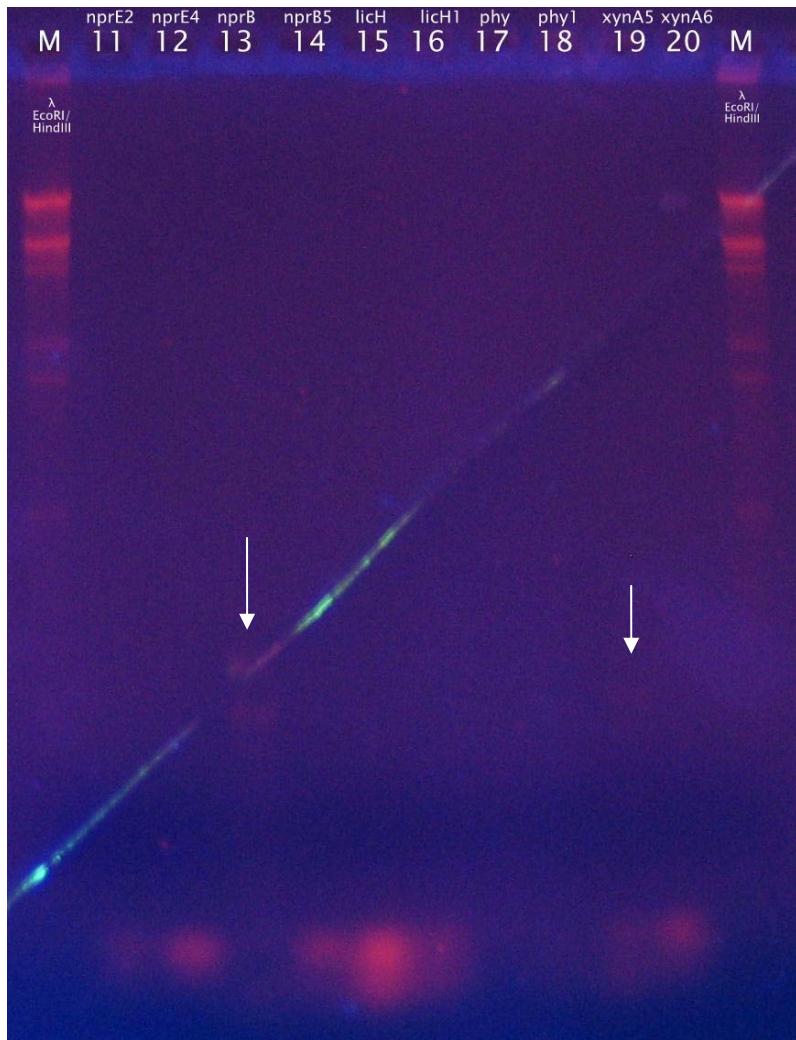


Slika 5: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 2 (vzorci 1 – 10)



Slika 6: Elektroforeza produktov PCR po izvedeni PCR reakciji Postopek 2 (vzorci 11 – 20)

Na slikah 5 in 6 so prikazani rezultati elektroforeze na 1 % agaroznem gelu. Na gela, prikazana na slikah 5 in 6, smo naložili vzorce, ki so bili rezultat PCR reakcije po Postopku 2 (temperatura naleganja 45 °C). Na gel, prikazan na sliki 5, smo naložili vzorce z oznakami od 1 do 10, na gel, prikazan na sliki 6, pa smo naložili vzorce z oznakami od 11 do 20. Pozitiven rezultat elektroforeze smo opazili pri vzorcih 3(*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*) in 12 (*nprE4*). Pri tej temperaturi naleganja smo s prvega gela (slika 5) izbrali vzorec 10 (*xynD2*), z drugega gela (slika 6) pa vzorca 11 (*nprE2*) in 12 (*nprE4*). Ostalih vzorcev, ki so pokazali pozitivno reakcijo, nismo izbrali, saj smo za te izbrane gene že dobili pozitivne rezultate pri višji temperaturi naleganja (50 °C).



Slika 7: Elektroforeza po izvedeni PCR reakciji Postopek 3 (vzorci 11 - 20)

Slika 7 prikazuje gel po izvedeni elektroforezi na 1 % agaroznem gelu. Na gel smo naložili vzorce, ki so bili rezultat PCR reakcije po Postopku 3 (temperatura naleganja 40 °C). Pozitiven rezultat smo opazili le pri vzorcih 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*).

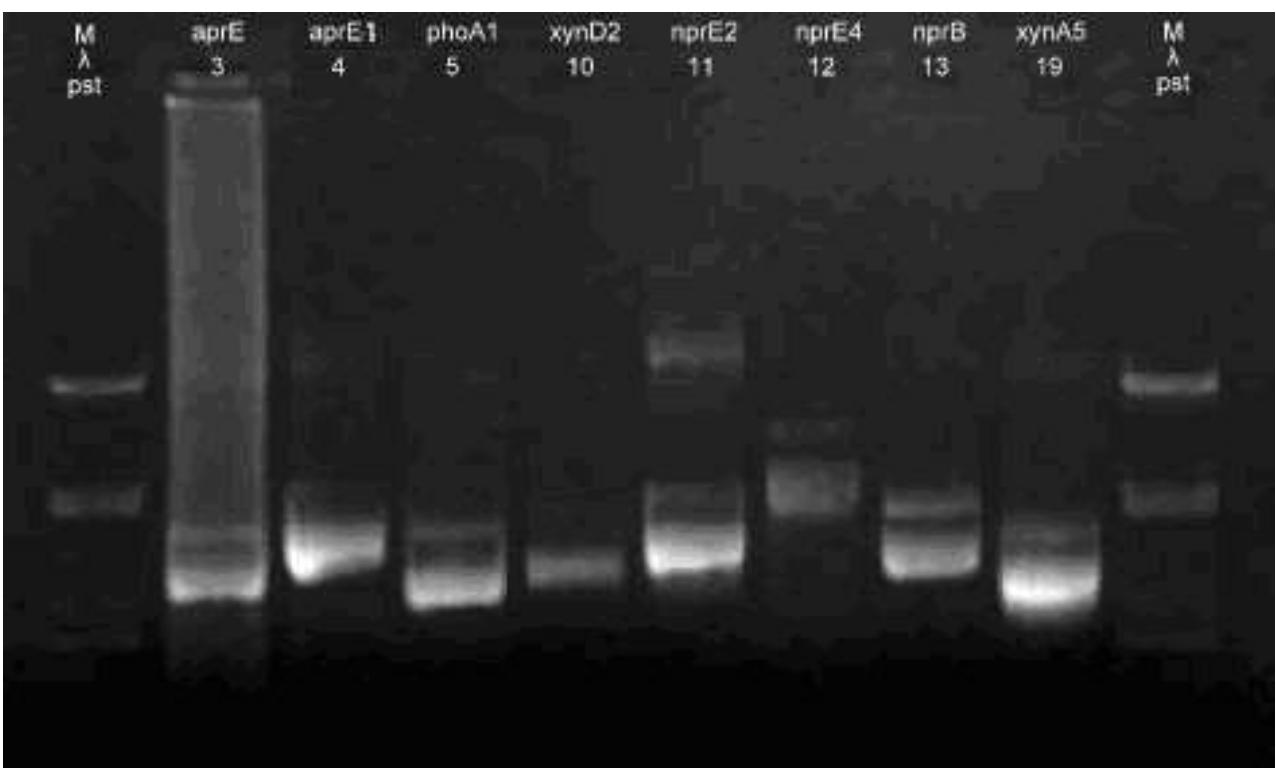
Na gelih je opaziti, da pri reakciji PCR ni nastal samo en produkt. Razlog temu je nižja temperatura naleganja, pri kateri nastanejo nespecifični produkti.

4.3 KLONIRANJE IZBRANIH GENOV SEVA *BACILLUS SUBTILIS* KBL 001

Posamezne pozitivne produkte reakcije PCR smo z ligacijo klonirali v vektor pGEM - T Easy. Vektorje z vključenimi geni smo transformirali v vnaprej pripravljene kompetentne celice *E.coli*. Nato smo izolirali transformante s kloniranimi geni in jim določili pripadajoče oznake: 3 (*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*).

4.4 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

Plazmidno DNA klonov smo izolirali s pomočjo Fermentasovega kita GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit pri vzorcih 3 (*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*) in 13 (*nprB*). Pri vzorcih z oznakami 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*) in 19 (*xynA5*) smo plazmidno DNA klonov izolirali po protokolu izolacije plazmidne DNA z alkalno lizo in jih očistili s Fermentasovim kompletom GeneJET™ PCR Purification Kit.



Slika 8: Elektroforeza izolirane plazmidne DNA

4.5 ANALIZA SEKVENC

Analizo sekvenc izoliranih genov 3 (*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*), smo izvedli s pomočjo programa BLAST. Naše sekvence smo primerjali z vsemi sekvencami v naboru NCBI. Sekvence so pokazale največjo podobnost s tipskim sevom *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168.

Vzorec št. 3 (*aprE*)

Za vzorec št. 3 (*aprE*) smo ugotovili, da smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati 67 bp dolg vključek. Analiza z BLASTom je pokazala, da se vključek ne ujema z nobeno sekvenco v zbirki sekvenc rodu *Bacillus*.

CTGAGGCCAGGTTGATCCTCCGCTTCTCACTCTTACCCCTCCGCTTCTC
ACTCTTACCCCTCTCCA

Vzorec št. 4 (*aprE1*)

Za vzorec št. 4 (*aprE1*) smo ugotovili, da smo v plazmid pGEM-T easy uspeli klonirati 423 bp dolg vključek. Analiza z BLASTom je pokazala, da se ta vključek v 98 % ujema z delom gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za superoksid dismutozo.

GGAGAGGGTAAAGAGTGAGAAGCCCTGAAAGATCAGATTCAAAAGCGAGG
ACAGCTTGACCAGTTGAAGATCAAATCGACAAGATGATTGAGGCTCTGG
AAGATGACCAAACAACAGAAGAAGATTGGTATAAACAGGCCGCTGCCCTT
TACCGGGATATTACAGAATCAGATGATACTAAAGTGAAAGACCGCATATGT
CCCTATAGGGAAACACGTGCTGCCAAGCTCCTTACAAATACTCCGCCT
TAGAACCTTATATTTCACCGCATATTATGGTCCTTCATCATACAAACAT
CATCAAAGCTATGTCGATGCCCTGAACAAAGCAGAACATCAGAGCTTAAAAA
AGCGAGAGCAACAAAGAATTATGACTTAATCACTCATTGGAAAGAGAGC
TTGCGTTCCATGATCGACGGATG

Score = 697 bits (377), Expect = 0.0
Identities = 391/398 (98%), Gaps = 0/398 (0%)

GTGAGAAGCCCTGAAAGATCAGATTCAAAAGCGAGGACAGCTTGACCAGTTGAAGATCA	74
GTGTGAAGCCCTGAAAGATCAGATTCAAAAGCGAGGTAGCTTGACCAGTTGAAGATCA	2104153
AATCGACAAGATGATTGAGGCCTGGAAAGATGACCAAACAAACAGAAGAAGATTGGTATAA	134
AATCGACAAGATGATTGAGGCCTGGAAAGATGACCAAACAAACAGAAGAAGATTGGTATAA	2104213

ACAGGCCGCTGCCCTTACGGGATATTACAGAACGTGCTGCAAAGCTCCTACAAATACTCCGCCTAGA	194
ACAGGCCGCTGCCCTTACGGGATATTACAGAACGTGCTGCAAAGCTCCTACAAATACTCCGCCTAGA	2104273
ATATGTCCCTATAGGGAAACACGTGCTGCCAAAGCTCCTACAAATACTCCGCCTAGA	254
TTATGTCCCTATAGGGAAACACGTGCTGCCAAAGCTCCTACAAATACTCCGCCTAGA	2104333
ACCTTATATTCACCGATATTATGGCCTTCATCATACAAAACATCATCAAAGCTATGT	314
ACCTTATATATCACCGATATTATGATCCTTCATCATACAAAACATCATCAAAGCTATGT	2104393
CGATGGCCTGAACAAAGCAGAACATCAGAGCTTAAAAAAGCGAGAGCAACAAAGAATTATGA	374
CGATGGCCTGAACAAAGCAGAACATCAGAGCTTAAAAAAGCGAGAGCGACAAAGAATTATGA	2104453
CTTAATCACTCATTGGAAAGAGAGCTTGCCTTCATG	412
CTTAATCACTCATTGGAAAGAGAGCTTGCCTTCATG	2104491

Vzorec št. 5 (*phoA1*)

Za vzorec št. 5 (*phoA1*) smo ugotovili, da smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati 49 bp dolg vključek. Analiza z BLASTom je pokazala, da se ta vključek v 100 % ujema z 20 bp gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za alkalno fosfatazo *phoA*.

GGAGAGCTGTGGTTATCCGCTTCCACGGTGAACACCTTTCCGTCGTAC

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.004
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

GGAGAGCTGTGGTTATCCGC	20
GGAGAGCTGTGGTTATCCGC	1018673

Vzorec št. 10 (xynD2)

Pri vzorcu št. 10 (*xynD2*) smo ugotovili, da smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati vključek neznane velikosti, uspešno sekveniranih pa je bil 910 bp. Analiza z BLASTom je pokazala, da se ta vključek v 96 % ujema z 78 bp gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za transkripcijski regulator produkcije ekstracelularne proteaze.

GGTGCTGGCCGTACTTCAGGTACGAAGATTGCACGATTGCGTATCAAT
TGAATGGAGCTTCCATTCTGAAATCGTAAGCGTGCAATCTCGTGACC
TGAATATTAATGAGTATCATATTTATGGATTGCGGATCAATTGAATGGA
GCTTCATTCTGAAATCGTAAGGACGGGCCAGCTGCAATCGGTATTGA
ATTCGCGGCCGCTGTAATTCTGCCTTATGGGACAGATCCAACGTGATG
ACTGCATCGCTTGTGGATTCTATACTGGAACCTAAATAGCTTGTGATT
CCTGTCGCCCTGTTCTGAGCGAAACGGTTATAGGGTCACCACTCCA
CAGACCATCCCATCCGAAAGAAGGAAGAGAAAAGGCAGGTGTCTAAAG
CATGAGCTAACTGATATTAATTGCTTTTCACTGCCGCTTCCAAC
CGGGAAACCTGTCATGCCAGATGACTTAATGAATCGGACAGCAAACGGAG
AGAGGCCTTATGGTGTGGTTATGATGCCGCTACCTGGCTATTGACGA
GATGAGCTGACAGCACGACTTCGAACTGAGGCAGGACGTCGATCAAAG
CTGAAAGTCTGTCATTCCATTCCAATTGGGTATTATGACATTGCAATTCT
GCTGCCTCTGTCCTGATTGTGCGCAGAGGATGGGTATTGAGGTGCGTACT
TGTCAATTGCGGAAGGTTCTAGCCCCAGACCAAACCTCCACCATGTCAA
CTCTAGATTACCTTTGAATCTAGACAGGAATATAAAATCCTGCTTCTGA
CCCTGAAGCTGCACAAAGGAATAATTCTGATCCTATTGATACTGCAC
ACAGACACTCTGGACCCAGGAAGACAGCTGGCTGTCTAGATGACTCGG
A

Score = 128 bits (69), Expect = 5e-26
Identities = 75/78 (96%), Gaps = 0/78 (0%)
Strand=Plus/Minus

TGACCTGAATATTAATGAGTATCATATTTATGGATTGCGGATCAATTGAATGGAGCTTC	155
TGACCTGAATATTAATGAGCATCATATTTATGGATTGCGTATCAATTGAATGGAGCTTC	1073533
CATTCTGAAATCGTGAAC 173	
CATTCTGAAATCGCGAA 1073515	

Preostali del nukleotidnega zaporedja vzorca (764 bp od mesta 173 do 901) smo tudi analizirali z BLASTom. Program v naboru vseh nukleotidnih sekvenc ni našel nobenih podobnosti.

Vzorec št. 11 (*nprE2*)

Pri vzorcu št. 11 (*nprE2*) smo ugotovili, da smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati 394 bp velik vključek. Analiza z BLASTom je pokazala, da se nukleotidno zaporedje vključka v 98 % ujema z delom gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za ohranjeni hipotetični protein membrane (putative integral membrane protein).

CGCCAGAACAAATTGACCAATAGTAATAAAATTGTTCCATTTACTCC
TCCATATTCCCAGTATGGAGTTCAAGCACATTAAACAATCGATCTC
ACATTAAGGAGTATGATCATGGGAAAAGACAGACAAGAGAAAAACTCAA
AGCTTCAGGCAGAGTCGAATCAGACCGCACCAGTCCATTCACTATGACG
GAGCGACAAGCCTTGAACAAAACGGAAGATTCAAAAAGCGAAAATCATAA
TACAAAAAAGCCAAACCACATATGGTTTGGGCTTTATCATTATCGCA
CACTATAGCTTGTATTGATCCCTCTCTGTGAGCCAATGATGGGTT
TCACCTTGATCACAAGGGCGCCTTGAAATCGTCAATTGTTGTTCT
GGCGA

Score = 686 bits (371), Expect = 0.0
Identities = 387/394 (98%), Gaps = 3/394 (0%)
Strand=Plus/Plus

CAG-AACAACAATTGACCAATAGTAATAAAATTGTTCCATTTAC-TCCTCCATATTCCC	61
CAGAAACCAC-ATTGACCAATAGTAATAAAATTGTTCCATTTACTTCCTCCATATTCCC	2393370
AGTATGGAGTTCAAGCACATTAAACAATCGATCTCACATTAAGGAGTATGATCATG	121
AGTATGGAGTTCAAGCACATTAAACAATCGATCTCACATTAAGGAGTATGATCATG	2393430
GGAAAAGACAGACAAGAGAAAAACTCAAAGCTTCAGGCAGAGTCGAATCAGACCGCGAC	181
GGAAAAGACAGACAAGAGAAAAACTCAAAGCTTCAGGCAGAGTCGAATCAGATCGCGAC	2393490
CAGTCCATTCACTATGACGGAGCGACAAGCCTTGAACAAAACGGAAGATTCAAAAGCGA	241
CAGTCCATTCACTATGACGGAGCGACAAGCCTTGAACAAAACGGAAGATTCAAAAGCGA	2393550
AAATCATAATACAAAAGCCAAACCACATATGGTTTGGGCTTTATCATTATCGCAC	301
AAATCATAATACAAAAGCCAAACCACATATGGTTTGGGCTTTATCATTATCGCAC	2393610
ACTATAGCTTGTATTGATCCCTCTCTGTGAGCCAATGATGGGTTCACCTTGAT	361
ACTATAGCTTGTATTGACCCCTCTCTGTGAGCCAATGATGGGTTCACCTTGAT	2393670
CACAAGGGCGCCTTGTAAATCGTCAATTGTT	395
CACAAGGGCGCCTTGTAAATCGGCAATTGTT	2393704

Vzorec št. 12 (*nprE4*)

Pri vzorcu št. 12 (*nprE4*) smo uspeli v vektor pGEM-T easy klonirati fragment DNA dolžine 1135 bp. Analiza z BLASTom je pokazala, da se nukleotidno zaporedje vključka v 95 % ujema z delom gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za membranski protein, inducirani pri pomanjkanju ogljika (med mesti 2963229 in 2937349).

AATT CGATATA CGT GCG GTT GAG CACA AA AT CGG CACT CCT AAA AT ATC
CCGG TAAA AT GAAT AT CCC GCT GT CC GATA CGT GT AAAA AGAT
ATT CACT GATA CATTC AGT GGAA AGCC CT CAAC CCTT CAAT AGC CT
TCT AGCC CGGT ATAG AC GCTT CCAT CGT TAGG CT CGG AT CCTT CT GAAC
TGAG CCC GTT GT CCC ACCGCC ATTAT CAT GAT GAAT CCT AAC ACCCA
GCAT GAT GATA GATA ATAC GCCC ATT CAAT CC ACT AT AT CGT GCTT CA
GGATT GAGATACACATT GCG CACC ATCC AA TAGCC CGC ATA ATT GAC AG
TGACAT ATT A TAGG CAAG CGGG ATAAGG CAAGT CAGA AT GT AT CGC GT
TTATCAGCGATTTCAGCACGATGGTCGCTCCGATAATCAGCCCCACTGA
AGCCATCAGCTGATTAGAAACGCCAACAGCGCCAAATGGAACCGATAT
CTCCTGAATACAGCAAGTACCCCCACATCAAACAGGCAAGCGCGTGGCA
AATACAGAGGCCCGAATCCAGTCTGTTCTTCAGCGGCTATACACCTC
CCCGAAGAAATCCTGGATCAAATAACGGCGACGCGTGTGCCGGCGTCAA
TCGCTGTAAAATAAAACCGCTCAAAACATAATGACAATGGAAAAAG
TATGAGGCCAAATGGCTGAAAAACGGCATTCCGGTAAAAATATAAGTCAT
TCCCACCGCAAGTGTGACGGCTCCCCCTGTTCTCCTTCTAAAGTCCAAC
CGATTCCCTGCTCAATT CAGG CAA AT GTAC GAC AT TCATGCCAAGCGTA
CGGAAAACCTCAGGCGTGTGTTAATCGCAAAGTAATCAGCAGGCTGTAA
AGCGGT CGCTGCAATCAGCGCCATGATGCCGACAAGACACTCAACAAGCA
TTGCGCCAACGCAACCGGCTTCAATT CACTCCATT TATT CAGCATTTC
GGTGTGTTCTGAGCCGACAAAGGCATGGAACCCAGAGATCGCCCCGCA
GGCGATGGTTATTGAGATGAACGCCAGACAGGT CCTGCCAGCACCGGCC
CGCCGCCCTTTACGAATTCTGCTACAGGTACAGTG

Score = 1777 bits (962), Expect = 0.0
Identities = 1073/1126 (95%), Gaps = 10/1126 (0%)
Strand=Plus/Plus

CCGACAAAGGCATGGAACCCAGAGATGCCCGCAGGCATGGTTATTGAGATGAACGGC	1075
CCGACAAAGGCATGGAACCCAGAGATGCCCGCAGGCATGGTTATTGAGATGAACGGC	2937303
CAGACAGGTCTGCCAGCACCGGCCCTTACGAATTCTG	1121
CAGACAGGTCTGCCAGCACCGGCCCTTACGAATTCTG	2937349

Vzorec št. 13 (nprB)

Pri vzorcu št. 13 (*nprB*) smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati fragment DNA dolžine 335 bp. Analiza z BLASTom je pokazala, da se nukleotidno zaporedje vključka v 99 % ujema z delom gena bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za protein plašča spore.

ACTGGCATATGGAGCAGGTAGCGTGTTCCTGATTCGGGTCGCTGATAAT
AATGTGATCCGGCCCCAGCTCGATGACGCCCGAAAAATCTCGAGC
CCCATTCTGCTGTTCAAATGTCATATAAAATGGTGGCCGTTTCCC
CGATTAGGCGAAAATATTCTCGATGTAAGATTCTCAACAGGCAGCAT
GCCGGGAACGCTTGGCCCGGTCTGACGGTAGGCCCCGATGGAATT
GAAAACCGCCGCCCTGCTGCTGGCCGGAAATCCAAATCCCTGCTGTCCT
TGTTGTCCTGCTGTCCTGCTCCATATGCCAGTA

Score = 579 bits (313), Expect = 2e-164
Identities = 315/316 (99%), Gaps = 0/316 (0%)
Strand=Plus/Minus

GGAGCAGGTAGCGTGTTCCTGATTCGGGTCGCTGATAATAATGTGATCCGGCCCCAG	70
GGAGCAGGTAGCGTGTTCCTGATTCGGGTCGCTGATAATAATGTGATCCGGCCCCAG	3893841
CTTCGATGACGCCCGAAAAATCTCGAGCCCCATTCTGCTGTTCAAATGTCATAT	130
CTTCGATGACGCCCGAAAAATCTCGAGCCCCATTCTGCTGTTCAAATGTCATAT	3893781
AAATGGTGGCCGTTTCCCGATTCAAGCGAAAATATTCTCGATGTAAGATTCTCAA	190
AAATGGTGGCCGTTTCCCGATTCAAGCGAAAATATTCTCGATGTAAGATTCTCAA	3893721
CAGGCAGCATGCCGGAACGCTTGGCCCGGTCTGACGGTAGGCCCCGATGGAATT	250
CAGGCAGCATGCCGGAACGCTTGGCCCGGTCTGACGGTAGGCCCCGATGGAATT	3893661
GAAAACCGCCGCCCTGCTGCTGGCCGGAAATCCAAATCCCTGCTGTCCTGTTGTCCT	310
GAAAACCGCCGCCCTGCTGCTGGCCGGAAATCCAAATCCCTGCTGTCCTGTTGTCCT	3893601
GCTGTCCCTGCTCCAT	326
GCTGTCCCTGCTGCAT	3893585

Vzorec št. 19 (*xynA5*)

Pri vzorcu št. 19 (*xynA5*) smo v vektor pGEM-T easy uspeli klonirati fragment DNA dolžine 41 bp. Analiza z BLASTom je pokazala, da se sekvenca vključka v 100 % ujema z delcema (20 bp in 23 bp) bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 za endo-1,4-beta -ksilanazo.

ATGGAGAATACCCCTACCTCCAGCCAAAGCTTTGATCGTCC

Score = 46.1 bits (23), Expect = 2e-06
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	ATGGAGAATACCCCTACCTCCAGC	23
Sbjct	2054466	ATGGAGAATACCCCTACCTCCAGC	2054468

Score = 40.1 bits (20), Expect = 1e-04
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	22	GCCAAAGCTTTGATCGTCC	41
Sbjct	2055316	GCCAAAGCTTTGATCGTCC	2055335

Preglednica 5: Seznam neujemanj in vrzeli ujemajočih delov sekvenc našega seva v primerjavi s tipskim sevom *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168

ime vzorca	število neujemanj	mesta	oblika napake		število vrzeli	mesta napake	
			<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	<i>B.subtilis</i> KBL 001		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	<i>B.subtilis</i> KBL 001
4 (aprE1)	6	18	T	A	0		
		51	T	A			
		153	T	C			
		264	A	T			
		280	A	G			
		360	G	A			
10 (xynD2)	3	115	C	T	0		
		136	T	G			
		170	C	T			
11 (nprE2)	4	10	C	A	3	2393221/2393222	6/7
		175	T	C			47/48
		322	C	T			
		387	G	T			
12 (nprE4)	43	8	C	T	10	2936449/2936450	55/56
		23	C	G		2936476/2936477	129/130
		29	G	A		2936499/2936500	215/216
		38	G	C		2936555/2936556	289/290
		67	G	T		2936978/2936979	755/756
		89	A	G			
		92	G	a			
		95	T	a			
		107	T	C			
		113	G	C			
		119	T	G			
		122	C	G			
		123	C	A			
		126	C	G			
		134	G	A			
		136	A	C			
		167	T	C			
		177	C	G			
		181	A	G			
		196	A	T			
		197	C	G			
		199	T	A			

se nadaljuje...

nadaljevanje Preglednica 5: Seznam neujemanj in vrzeli ujemajočih delov sekvenc našega seva v primerjavi s tipskim sevom *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168

ime vzorca	število neujemanj	mesta	oblika napake	število vrzeli	število vrzeli	mesta napake	
			<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> str. 168	<i>B.subtilis</i> KBL 001		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	<i>B.subtilis</i> KBL 001
			203	C	A		
			208	A	G		
			213	T	G		
			217	A	C		
			226	C	T		
			227	G	T		
			230	A	C		
			239	G	C		
			281	A	C		
			359	A	T		
			394	C	T		
			406	G	A		
			424	C	G		
			478	G	C		
			610	G	A		
			634	A	G		
			667	G	A		
			763	C	T		
			810	C	T		
			928	A	G		
			1002	T	G		
13 (nprB)	1	323	G	C	0		

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo z metodo PCR in s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi izolirali nukleotidna zaporedja določenih genov seva *B.subtilis* KBL 001. Želeli smo določiti zaporedja nukleotidov nekaterih označevalnih genov (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy* in *nprB*) ter le-ta uporabiti kot razvoj orodij za sledenje, oziroma preverjanje istovetnosti mikroorganizma v lastnem izdelku ter hkrati te metode uporabiti v kontekstu zaščite lastnega seva (*Bacillus subtilis* KBL 001) pred morebitnimi krajami. Izbrane gene smo klonirali, da bi primerjali zaporedja nukleotidov v genih seva KBL 001, katere nam je uspelo izolirati z zaporedjem nukleotidov tipskega seva *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168.

Najprej smo izolirali kromosomsko DNA izbranega seva *B.subtilis* – KBL 001. Vzporedno smo izbrali 10 genov, ki kodirajo proteine, opisane v Preglednici 2 na strani 16, za katere smo želeli izolirati zaporedja nukleotidov DNA. Konstruirali smo začetne oligonukleotide in izvedli PCR. Pri vzorcih, pri katerih je bil PCR uspešen (vzorci označeni s 3 (*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoAI*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*)), smo po ustremnem protokolu izvedli ligacijo produktov PCR z vektorjem pGEM[®] - T Easy. Po uspešni transformaciji smo zrasle transformante z oznakami 3 (*aprE*), 4 (*aprEI*), 5 (*phoAI*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*) namnožili v tekočem LB gojišču z dodatkom ampicilina, jih alikvotirali v mikrocentrifugirke, dodali sterilen glicerol in do uporabe shranili na -80 °C. Izbrane vzorce smo nato namnožili v tekočem LB z dodatkom ampicilina in izolirali plazmidno DNA. Pri vseh vzorcih, razen pri vzorcih 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*) in 19 (*xynA5*), smo DNA izolirali s pomočjo kompleta GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Vzorčkom 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*) in 19 (*xynA5*) smo plazmidno DNA izolirali s postopkom izolacije plazmidne DNA z alkalno lizo. Izolirano plazmidno DNA smo nato prečistili s kompletom GeneJET™ PCR Purification Kit. Uspešnost izolacije plazmidne DNA vseh vzorcev smo preverili z elektroforezo. Izbrane vzorce z izolirano plazmidno DNA smo nato poslali na sekveniranje

v podjetje Macrogen v Koreji. Za potrebe sekveniranja so tam uporabili T7 in SP6 začetna oligonukleotida. Rezultate sekvenc smo nato analizirali na spletu s pomočjo BLASTa.

Pri PCR reakcijah je, kadar poskušamo zagotoviti primerno specifičnost reakcije, kritična predvsem temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov. Lise, vidne na slikah agaroznih gelov, so pri temperaturah 45 °C in 40 °C razmazane, kar kaže na nastanek nespecifičnih PCR produktov. Nastanek nespecifičnih produktov je pri nizkih temperaturah naleganja pogost. Za dokazovanje rezultatov PCR reakcij največkrat uporabimo metodo ločevanja delcev DNA po velikosti s pomočjo elektroforeze v agaroznem gelu. Kadar po končani elektroforezi v gelu opazimo samo en fragment, lahko skoraj zagotovo potrdimo, da gre za pozitiven rezultat. Kadar pa se, tako kot pri nas, pojavi večje število fragmentov, moramo rezultate elektroforeze potrditi še s katero od bolj specifičnih metod dokazovanja. Najhitreje in najenostavnije bi lahko to dokazali z encimsko restrikcijo PCR produkta. Drugi način, s katerim lahko potrdimo specifičnost PCR produkta, je določanje njegovega nukleotidnega zaporedja (to metodo smo uporabili mi), ali hibridizacijske tehnike (Poljak in sod., 1994).

V nalogi smo se osredotočili na specifične gene probiotičnega seva bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS 117162), sintetizirali za izbrane gene specifične začetne oligonukleotide in izvedli reakcijo PCR. Ker reakcija PCR pri začetni temperaturi naleganja 50 °C ni bila dovolj uspešna, smo temperaturo nižali (45 °C in 40 °C), s tem pa dobili nespecifične produkte. Pri izvedbi PCR reakcije smo uporabili Taq polimerazo, katera nima tako imenovanega »proof readinga«. Če bi bilo naleganje naših začetnih oligonukleotidov brezhibno, bi pričakovali dobre produkte pri višjih temperaturah (50 °C). Reakcija PCR je bila uspešna v 9 od 20 primerov. Pozitivne rezultate smo dobili pri vzorcih 3 (*aprE*), 4 (*aprE1*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*). Nizek izkoristek reakcije bi morda lahko pripisali slabši kvaliteti kromosomske DNA, ali pa nespecifičnemu naleganju začetnih oligonukleotidov zaradi nižjih izbranih temperatur naleganja.

Po ligaciji z vektorjem pGEM T-easy, smo vektorje z vključenimi geni transformirali v kompetentne *E.coli*, nato izolirali plazmidno DNA in vzorce poslali na določanje zaporedja nukleotidov. Analize so pokazale, da nam ni uspelo izolirati natančno želenih genov.

Preglednica 6: Rezultati analize sekvenc, izoliranih iz bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001

vzorec	velikost PCR produkta	ujemanje PCR produkta s tipsko sekvenco <i>B.subtilis</i> 168
3	67 bp	insert se ne ujema z nobeno sekvenco v naboru nukleotidnih sekvenc na NCBI
4	423 bp	98 % ujemanje z delom gena (398 bp) za superoksid dismutazo
5	49 bp	100 % ujemanje z delom gena (20 bp) za alkalno fosfatazo phoA
10	910 bp	96 % ujemanje z delom gena (78 bp) za regulator produkcije ekstracelularne proteaze, ostali del sekvene ne ustreza nobeni sekvenci v naboru nukleotidnih sekvenc na NCBI.
11	394 bp	98 % ujemanje z delom gena (394 bp) za ohranjeni hipotetični protein membrane
12	1135 bp	95 % ujemanje z delom gena (1126 bp) za membranski protein, inducirani pri pomanjkanju ogljika
13	335 bp	99 % ujemanje z delom gena (316 bp) za protein plašča spore
19	41 bp	100 % ujemanje z delcem (20 in 23 bp) za endo-1,4-β-ksilanazo

Za potrebe sledenja oziroma preverjanja istovetnosti izbranega mikroorganizma bi se bilo potrebno osredotočiti na metodo, za katero smo prepričani, da nam bo pomagala pri prepoznavanju našega seva, če bi ga kdo posvojil. Za sekvene, katere smo v okviru te diplomske naloge dobili z reakcijo PCR, četudi so nastali nespecifični produkti, je potrebno sintetizirati specifične začetne oligonukleotide in v bodoče PCR narediti pri striktnih pogojih. Če pri optimizirani reakciji PCR ne dobimo nobenega produkta, lahko z gotovostjo trdimo, da analizirani vzorec ni enak našemu komercialnemu pripravku. V primeru, da po izvedeni reakciji PCR dobimo produkt, izvedemo encimsko restrikcijo PCR produkta. Če se restrikcijski vzorec produkta PCR ne ujema z restrikcijskim vzorcem našega komercialnega pripravka, lahko potem trdimo, da analizirani vzorec ne vsebuje našega seva. V kolikor pa se restrikcijski vzorec pripravka, katerega analiziramo, ujema z

restriktičnim vzorcem našega seva, je potrebno izvesti analizo zaporedja nukleotidov produkta PCR reakcije analiziranega vzorca.

Za izvedbo kvantitativne reakcije PCR (qPCR) bi bilo potrebno uporabiti univerzalno sekvenco (npr. 16S rRNA). Najprej bo potrebno pripraviti univerzalne začetne oligonukleotide za 16S rRNA in kalibracijsko krivuljo. Šele nato, lahko začnemo izvajati qPCR.

Za zagotovitev ustreznosti rezultatov, je potrebno molekularno genetske analize kombinirati z določenimi mikrobiološkimi metodami (odpornost proti antibiotikom...) in biokemijskimi analizami (API testi...).

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov, zbranih v diplomski nalogi, lahko zaključimo:

- v zaporedju nukleotidov DNA genov, katere smo izolirali iz probiotika *Bacillus subtilis* KBL 001, smo določili razlike med našim sevom in tipskim sevom *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168.
- Vzorci 4 (*aprE*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*) in 13 (*nprB*) bodo osnova za razvoj orodij za PCR metode, genske sonde, specifične začetne oligonukleotide, ki bodo nalegali pri ustreznih temperaturah.
- Pri vzorcu 10 (*xynD2*) kažejo rezultati na veliko specifičnost zaporedja, katero se ne ujema z nobeno sekvenco v naboru sekvenc na NCBI. Ta podatek je za nas odličen, vendar pa bo potrebno zaradi specifičnosti zaporedja preveriti, ali ne gre morda samo za napako ter pogledati z drugimi iskalnimi orodji, kakšno je njegovo G/C razmerje – če ustreza razmerju našega seva in kodonsko rabo – če ustreza našemu sevu.
- Potrebno je optimizirati metodo PCR – ugotoviti najprimernejšo temperaturo naleganja začetnih nukleotidov.
- Potrebno je določiti zaporedja nukleotidov kromosomske DNA našega seva in šele nato izvesti PCR po optimizirani metodi, z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za naš sev. Rezultate teh pozitivnih reakcij PCR že lahko uporabimo kot orodje za preverjanje istovetnosti komericalnega pripravka.

6 POVZETEK

Za pospeševanje rasti živali so v preteklosti množično uporabljali antibiotike. Zaradi povečevanja rezistence bakterij proti antibiotikom, je Evropska Unija njihovo uporabo v neterapevtske namene prepovedala. Probiotični izdelki so se v različnih raziskavah izkazali kot možni terapeutiki in pospeševalci rasti.

Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljeni metoda ugotavljanja vsebnosti živih probiotikov. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah in materialih, katere je mogoče homogenizirati. Rezultat izražamo kot število KE v mililitru ali gramu vzorca (Kaiser, 2005) Zaradi časovne zamudnosti klasičnih metod so se razvile različne tehnike za hitrejše, bolj občutljive in specifične ter avtomatizirane metode (Mothershed in Whitney, 2005). Ena izmed takšnih metod je tehnika PCR.

Pri izvedbi diplomskega dela smo izbrali deset genov probiotičnega seva bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS 117162). Ti geni (*amyE*, *xynD*, *xynA*, *aprE*, *phoA*, *phoB*, *nprE*, *licH*, *phy* in *nprB*) kodirajo različne proteine. Po konstrukciji začetnih oligonukleotidov, smo izvedli reakcije PCR pri treh različnih temperaturah naleganja – 50 °C, 45 °C in 40 °C. Pozitivne rezultate reakcije PCR smo dobili pri vzorcih 3 (*aprE*), 4 (*aprE1*), 5 (*phoA1*), 10 (*xynD2*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*), 13 (*nprB*) in 19 (*xynA5*). Namnožene gene smo po ligaciji z vektorjem pGEM T-easy transformirali v kompetentne *E.coli*, nato izolirali plazmidno DNA in le-to poslali na določanje zaporedja nukleotidov.

Izolirane PCR produkte smo primerjali s tipsko sekvenco *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168. Zaporedja nukleotidov DNA analiziranih vzorcev iz probiotičnega seva bakterije *Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS117162) se med 95 % in 99 % ujemajo z različnimi geni tipskega seva *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str 168.

Za razvoj PCR metod, genskih sond in specifičnih začetnih oligonukleotidov bo potrebno najprej določiti zaporedja nukleotidov kromosomske DNA našega seva (*Bacillus subtilis* KBL 001 (CBS117162) in šele nato izvesti PCR po optimizirani metodi. V Krki, d.d. bodo kot osnovo za razvoj teh metod uporabili vzorce 4 (*aprE*), 11 (*nprE2*), 12 (*nprE4*) in 13 (*nprB*). Pri vzorcu 10 (*xynD2*) kažejo rezultati na veliko specifičnost zaporedja, ki se ne ujema z nobeno sekvenco v naboru sekvenc na NCBI. Zaradi specifičnosti zaporedja bo potrebno z drugimi iskalnimi orodji preveriti, če G/C razmerje in kodonska raba ustreznata našemu sevu.

V interesu proizvajalca probiotičnega dodatka h krmi je zagotoviti sledenje oziroma preverjanje istovetnosti mikroorganizma v njegovem izdelku, navsezadnje pa tudi uporaba istih metod v kontekstu zaščite lasnega seva pred morebitnimi krajami. Za sledenje oziroma preverjanje istovetnosti mikroorganizma v izdelku uporabljam različne metode – tako kvalitativne kot kvantitativne. Kvalitativne metode vključujejo nacepitev sevov na gojišče ter ogled zraslih kolonij na petrijevkah ter identifikacijo zraslih kolonij z osnovnimi testi, kjer opazujemo makrotipske, mikrotipske, fiziološke, biokemijske, antigenske, kemotaksonomske in genotipske lastnosti. Nadalje se lahko poslužujemo tehnik, ki omogočajo ločevanje na nivoju vrst in sevov. S temi testi lahko zagotovimo sledljivost, služijo pa nam tudi kot pomoč za zaščito pred krajo. Da lahko z gotovostjo potrdimo ustreznost rezultatov analiz, je potrebno molekularno genetske analize (PCR, encimska restrikcija PCR produkta, sekveniranje) kombinirati z določenimi mikrobiološkimi metodami (odpornost na antibiotike...) in biokemijskimi analizami (API testi...).

Z orodji za kvantitativno detekcijo pa preverjamo ustreznost sevov. Če želimo določiti, koliko je našega seva v komercialnem izdelku, lahko izvedemo kvantitativni PCR (qPCR) in s pomočjo vnaprej narejenih umeritvenih krivulj določimo količino seva. S kvantitativnim PCR lahko tudi diferencialno ločujemo bakterije istih rodov med seboj.

7 VIRI

Avguštin G. 2006. Manipulacija mikrobnega metabolizma v prebavilih. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 28-28
http://www.bfro.uni-lj.si/Kat_mikro/avg/pdf/20%20Manipulacija_2006.pdf

Gardiner G., Ross R., Kelly P., Stanton C., Collins J., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, John Wiely & Sons: 431-478

Duc Le H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M.. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. Applied and Environmental Microbiology, 70: 2161–2171

Kaiser G.E. 2005. Enumeration of microorganisms. Catonsville, The Community College of Baltimore Country: 1-1

<http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab4/lab4.html>

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriis R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Conner-ton I.F., Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature, 390: 249-256

Madigan M.T., Matinko J.M., Parker J. 2002. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddler River, Prentice-Hall International: 980 str.

Marteau P.R., de Vrese M., Cellier C.J., Schrezenmeir J..2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 430-436

MOP – ARSO. 2001. Pregled stanja biotske raznovrstnosti in krajinske pestrosti v Sloveniji. Ljubljana, MOP – Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije – ARSO – Agencija Republike Slovenije za okolje. 3. del: 138-140
http://www.arso.gov.si/narava/poročila%20in%20publikacije/biotska_raznovrstnost3.pdf

Mothershed E., Whitney A.M. 2005. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. Clinica Chimica Acta, 363: 206-220

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379 – 400

Predloga zakona o ratifikaciji sprememb budimpeštanske pogodbe o mednarodnem priznanju depozita mikroorganizmov za postopek patentiranja (obrazložitev). 2006. Ljubljana, Vlada Republike Slovenije: 5-5

http://www2.gov.si/zak/Pre_Zak.nsf/63b9e6330bddeaadc1256616002a0b55/8fc7f41a56bfc225c1257245002a7d64?OpenDocument&ExpandSection=1

Priest G.F. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriological reviews. American Society for Microbiology, 41, 3: 711-753

Promega. 2009. pGEM-T and pGEM-T easy vector systems. Madison, Promega Corporation: 11-11

Stopar D. 2005a. Industrijska mikrobiologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 20-21

<http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro//homepage/industrijskaMIKROBIOLOGIJA.pdf>

Stopar D. 2005b. Določanje strukture mikrobne združbe. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-8

<http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro//homepage/strukturaZDRUZBE.pdf>

Todar K. 2009. Todar's online textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin University of Wisconsin: 2-2

<http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>

Turk M., Gostinčar C. 2008. Taksonomija in identifikacija bakterij: navodila za vaje.
Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 7-7

Vector NTI TM. 2007. Vector NTI TM : version 10. Carlsbad, California. Invitrogen Corporation: software

Wikipedia. 2009. *Bacillus subtilis*. Florida, Wikimedia Foundation: 3-3

http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis

WIPO. 2010. Understanding industrial property. Geneve. WIPO – World Intellectual Property Organisation: 3-4

http://www.wipo.int/freepublications/en/intproperty/895/wipo_pub_895.pdf

Zachar V., Thomas A.R., Goustin S.A..1993. Absolute quantification of target DNA: A simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. Nucleic Acids Research, 21, 8: 2017-2018

Zakon o ratifikaciji Budimpeštanske pogodbe o mednarodnem priznanju depozita mikroorganizmov za postopek patentiranja in pravilnika Budimpeštanske pogodbe o mednarodnem priznanju depozita mikroorganizmov za postopek patentiranja (MBPMPD).1997. Uradni list republike Slovenije, 17, 61: 2023-2023

ZAHVALA

Prof. dr. Darji Žgur Bertok se zahvaljujem za mentorstvo. Posebej hvala za to, da mi je za mentorja v Krki, d.d. predlagala dr. Aleša Gaspariča.

Dr. Aleš Gasparič mi je predstavil, kako čudovito izgleda samostojno delo v laboratoriju. Za to se mu iskreno zahvaljujem. Hkrati hvala za strokovno vodenje, svetovanje, pomoč in potrpežljivost ter dolge poučne pogovore.

Hvala prof. dr. Ireni Rogelj za kritičen in hiter pregled diplome.

Delavcem v kolektivu biokemije se zahvaljujem za pomoč. Še posebej Maji, Petri in Matjažu. Hvala, da sem se lahko zanesla na vas.

Idi, Jani in Katarini hvala za vse zapiske, vzpodbudne in tolažilne besede, pohvale, jutranje kave, pozna kosila... Hvala za čudovito prijateljstvo, ki se je stkalo med študijem.

Hvala vsem mojim domačim in prijateljem, ki so mi nudili predvsem nestrokovno pomoč in podporo.

Zadnja, a nič manj pomembna zahvala gre staršema, ki sta potrpežljivo čakala in dočakala zaključek mojega študija. Sama beseda "hvala" ne bi bila dovolj, da povem, koliko sem vama hvaležna. Sta preprosto ... zlata.

PRILOGE

Priloga A: Seznam restriktičnih encimov, uporabljenih za kreiranje restriktične mape

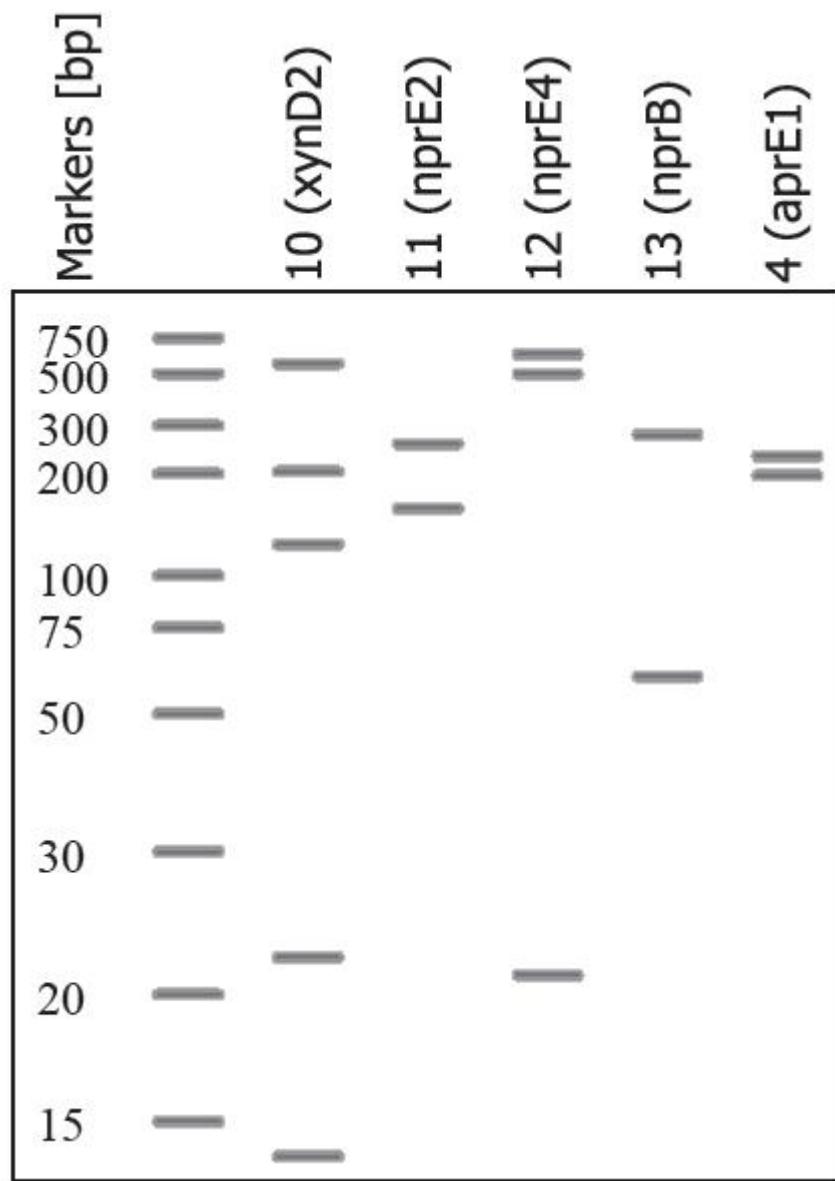
Ime encima	Zaporedje, katerega encim prepozna
BamHI	GGATCC
BglII	AGATCT
EcoRI	GAATTTC
EcoRV	GATATC
HindIII	AAGCTT
PstI	CTGCAG
SalI	GTCGAC
SmaI	CCCGGG
XbaI	TCTAGA
XhoI	CTCGAG

Priloga B: Restriktičnska mapa produktov PCR

vzorec	dolžina fragmenta	regija, kjer je fragment rezan	mesto reza encima	Encim, ki reže na levi strani	Encim, ki reže na desni strani
10 (<i>xynD2</i>)	203	1..203TTAA		EcoRI
10 (<i>xynD2</i>)	557	200..756	AATTCGC.....ACT GCG.....TGAGA	EcoRI	XbaI
10 (<i>xynD2</i>)	22	753..774	CTAGATT.....AAT TAA.....TTAGA	XbaI	XbaI
10 (<i>xynD2</i>)	121	771..891	CTAGACA.....TGT TGT.....ACAGA	XbaI	XbaI
10 (<i>xynD2</i>)	13	888..901	CTAGATG.....GGA TAC.....CCT	XbaI	
11 (<i>nprE2</i>)	154	1..154TCGA		HindIII
11 (<i>nprE2</i>)	255	151..405	AGCTTCA.....CGA AGT.....GCT	HindIII	
12 (<i>nprE4</i>)	498	1..498		EcoRV
12 (<i>nprE4</i>)	620	499..1118	ATC.....ACG TAG.....TGCTT	EcoRV	EcoRI
12 (<i>nprE4</i>)	21	1115..1135	AATTCTG.....GTG GAC.....CAC	EcoRI	
13 (<i>nprB</i>)	276	1..276		SmaI
13 (<i>nprB</i>)	59	277..335	GGG.....GTA CCC.....CAT	SmaI	
4 (<i>aprE1</i>)	230	1..230TCGA		HindIII
4 (<i>aprE1</i>)	197	227..423	AGCTTCC.....ATG AGG.....TAC	HindIII	

Priloga C: Simulacija gelske elektroforeze

DNA vzorcev je rezana z encimi, naštetimi v Prilogi A.



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja DULAR

**OZNAČEVALNI GENI PROBIOTIČNEGA SEVA
BAKTERIJE *Bacillus subtilis* KBL-001 - ORODJE ZA
ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI TER ZAŠČITO
INDUSTRISKE LASTNINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010