

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jerica MRAZ

**ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH KLAMIDIJ
V ŽIVALSKIH GOSTITELJIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jerica MRAZ (PLEŠKO)

**ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH KLAMIDIJ V ŽIVALSKIH
GOSTITELJIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISCOVERING THE SO FAR UNDESCRIBED CHLAMYDIAE IN
ANIMAL HOSTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Tkiva vretenčarjev smo dobili z veterinarskih pregledov na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani od dr. Alenke Dovč, tkiva talnih členonožcev od doc. dr. Roka Kostanjška z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, aktivno blato pa iz centralne čistilne naprave Domžale – Kamnik.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin, za somentorja doc. dr. Rok Kostanjšek in za recenzentko prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin
Somentor: doc. dr. Rok Kostanjšek
Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član: prof. dr. Gorazd Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: doc. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jerica Mraz

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.25:577.2.08:595/.596(043)=863
- KG klamidije/DNK/RNK/prebavila gostiteljev/molekularne tehnike/
PCR/DGGE/kloniranje/sekvenciranje/'*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'
- AV MRAZ (PLEŠKO), Jerica
- SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/KOSTANJŠEK, Rok (somentor), MARINŠEK
LOGAR, Romana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2006
- IN ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH KLAMIDIJ V ŽIVALSKIH
GOSTITELJIH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 59 str., 18 sl., 9 pregl., 54 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V zadnjem času so odkrili predstavnike doslej še neznane skupine klamidij, ki predstavlja samostojno evolucijsko vejo v redu *Chlamydiales*. Namen diplomskega dela je bil iz vzorcev različnih živali osamiti skupno mikrobno DNK in z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ugotoviti, ali so v njih prisotne klamidijske sekvence. Zaradi tesne povezanosti gostiteljev in simbiotov in posledično majhne verjetnosti, da bi neznane klamidije uspeli osamiti in gojiti v *in vitro* razmerah, smo uporabili direktne molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji in analizi nukleinskih kislin. Za določitev najbolj primerne metode za izolacijo DNK smo iz vzorcev dveh živali s štirimi različnimi metodami izolirali skupno mikrobno DNK, izmerili njeno koncentracijo, preučili njeno kakovost in pomnožili dele bakterijskih ribosomskih genov s PCR. Pomnožke smo ločili z poliakrilamidno gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE). Iz vseh živalskih vzorcev smo nato z metodo z ultrazvokom in CTAB izolirali DNK in specifično pomnožili dele klamidijskih ribosomskih genov s specifičnima začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r. Z molekulskim kloniranjem in DGGE smo ugotovili, da je v preučeni pomnožki prisoten le en tip sekvence in nato pomnožka vzorcev zadnjega dela črevesa iz pajka *Dysdera ninnii* sekvencirali. Primerjalna analiza sekvenc je pokazala, da sta sekvenci iz *D. ninnii* zagotovo klamidijskega izvora in skoraj enaki sekvenci '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' iz enakonožnega raka *Porcellio scaber*. Poravnava in primerjava sekvenc nam je pokazala, da je v klonih prisotnih več različnih sekvenc, ki pa so si med seboj zelo podobne.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.25:577.2.08:595/.596(043)=863
- CX *Chlamydia*/DNA/RNA/hosts gut/molecular methods/
/PCR/DGGE/kloning/sequencing/'*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'
- AU MRAZ (PLEŠKO), Jerica
- AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/KOSTANJŠEK, Rok (co-advisor), MARINŠEK
LOGAR, Romana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2006
- TI DISCOVERING THE SO FAR UNDESCRIBED CHLAMYDIAE IN ANIMAL
HOSTS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 59 p., 18 fig., 9 tab., 54 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Recently we are witnessing the discovery of representatives of the so far unknown group of chlamydiae, which represents autonomous evolution branches within the *Chlamydiales* order. The aim of this thesis was to isolate total microbe DNA from samples of different animals and to establish by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers whether they contain chlamydial sequences. Because of the close association between the hosts and symbiotes, which is well known for chlamydiae, and consequently low probability of isolating and culturing the unknown chlamydiae in *in vitro* conditions, direct molecular techniques which are based on isolation and nucleic acids analysis were used. In order to determine the most suitable method for the isolation of DNA, four different isolation methods were compared on two chosen samples. Yield and quality of the isolated DNA were compared, and parts of bacterial ribosomal genes were PCR amplified with conserved primers and separated with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The method employing ultrasonic cell disintegration and CTAB was chosen as the most appropriate and used on all samples. Parts of chlamydial ribosomal genes were specifically amplified with primers CHL_16S(270)f and CHL_16S(530)r. Using molecular cloning and denaturing gradient gel electrophoresis we have established that only one type of the sequence is present in the PCR amplicons. Two samples obtained from the hindgut of the spider *Dysdera ninnii* were sequenced and the comparative sequence analysis revealed that the sequences from *D. ninni* are definitely of chlamydial origin and almost identical to the ribosomal sequence from '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' from the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. We also wanted to know to what extent the sequences are similar to each other and performed therefore the sequence alignments which showed that several different sequences were present in the clones, with only minimal differences observed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VIII
Kazalo preglednic	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 METODE ZA ANALIZO MIKROBNE ZDRUŽBE	2
2.1.1 Tradicionalne mikrobiološke metode	2
2.1.2 Molekularne metode	2
2.1.2.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE; angl. <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>)	4
2.2 KLAMIDIJE	5
2.2.1 Biologija klamidij	5
2.2.2 Taksonomija redu <i>Chlamydiales</i>	6
2.2.3 Klamidije kot povzročitelji okužb pri vretenčarjih	7
2.2.4 Klamidijske okužbe nevretenčarjev	8
2.2.5 Iskanje možnih gostiteljev	10
2.3 NAČRT DELA	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Vzorci	13
3.1.2 Kompleti	15
3.1.3 Pufri in raztopine	16
3.1.4 Gojišča	16
3.2 METODE	17
3.2.1 Izolacija skupne mikrobne DNK	17
3.2.1.1 Metoda s proteinazo K, SDS in CTAB (Ausubel in sod., 1999)	17
3.2.1.2 Metoda s krogličnim stresalcem in CTAB	17

3.2.1.3	Metoda z ultrazvokom in CTAB	18
3.2.1.4	Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB	19
3.2.2	Merjenje koncentracije izolirane mikrobne DNK	19
3.2.3	Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	20
3.2.4	Agarozna gelska elektroforeza	21
3.2.5	Kloniranje	22
3.2.6	Izolacija plazmidne DNK	23
3.2.7	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE; angl. <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>)	23
3.2.8	Priprava začetnih oligonukleotidov	23
3.2.9	Sekvenciranje in analiza sekvenc	24
4	REZULTATI	25
4.1	IZBIRA PRIMERNE METODE ZA IZOLACIJO DNK	25
4.1.1	Količina izolirane DNK	25
4.1.2	Kvaliteta izolirane DNK	27
4.1.3	Primernost izolirane DNK za molekularno biološke analize	28
4.2	PRIPRAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	30
4.3	NAMNOŽEVANJE BAKTERIJSKIH 16S RIBOSOMSKIH GENOV V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO DNK (PCR)	34
4.3.1	Namnoževanje klamidijevih 16S ribosomskih genov v verižni reakciji s polimerazo DNK (PCR)	35
4.4	KLONIRANJE KLAMIDIJSKIH POMNOŽKOV	37
4.4.1	Analiza klonov z DGGE	38
4.5	SEKVENCIRANJE IN ANALIZA SEKVENC	41
4.5.1	Sekvenciranje genov za 16S rRNK izbranih klonov in analiza sekvenčnih podatkov	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	IZBIRA PRIMERNE METODE ZA IZOLACIJO DNK	46
5.2	PRIPRAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	47
5.3	NAMNOŽEVANJE 16S RIBOSOMSKIH GENOV V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO DNK (PCR)	47
5.4	DOKAZOVANJE KLAMIDIJSKEGA IZVORA POMNOŽENIH DELOV RIBOSOMSKIH RNK	48
5.5	ANALIZA POMNOŽENIH IN KLONIRANIH KLAMIDIJSKIH RIBOSOMSKIH SEKVENC	50
5.6	SKLEPI	51

6	POVZETEK	53
7	VIRI	55
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 2.1:	življenski cikel klamidij; infekcijska elementarna telesa so obarvana rdeče, večja, replikativna retikularna telesa pa zeleno. EB = elementarno telo, RB = retikularno telo. (The chlamydial... , 2005)	5
Slika 2.2:	Okužene prebavne žleze kopenskega enakonožca <i>Porcellio scaber</i> . (z dovoljenjem doc. dr. Roka Kostanjška).	9
Slika 2.3:	' <i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> ' v vakuolah celic hepatopankreasa pri enakonožnem raku <i>Porcellio scaber</i> ; podolgovata, paličasto oblikovana elementarna. (z dovoljenjem doc. dr. Roka Kostanjška).	10
Slika 3.1:	Primeri vzorcev tkiv talnih členonožcev.	13
Slika 3.2:	Kroglični stresalec (Mini-beadbeater ...).	18
Slika 3.3:	Ultrazvočni razbijalec celic Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (MSE Soniprep... , 2001).	19
Slika 4.1:	Elektroforetska ločitev izolirane DNK iz vzorcev črevesa z blatom črnega laboda in slepega črevesa kunca s štirimi izolacijskimi metodami v 0,8 % agaroznem gelu.	26
Slika 4.2:	Elektroforetska ločitev PCR pomnožkov v 1 % agaroznem gelu.	28
Slika 4.3:	DGGE elektroforetska ločitev Eub338gc/534 pomnožkov PCR iz izbranih vzorcev.	30
Slika 4.4:	Elektroforetsko ločeni pomnožki PCR, namnoženi z začetnima oligonukleotidoma F968/R1401.	34
Slika 4.5:	Elektroforetsko ločeni pomnožki PCR, namnoženi z začetnima klamidijiskima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r.	35
Slika 4.6:	Elektroforetsko ločeni eluirani pomnoženi deli ribosomskih genov vzorca 5, ki je 50 x redčen in vzorca 6, ki je 10 x redčen z začetnima klamidijiskima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r.	37
Slika 4.7:	Plazmidna DNK 16 naključno izbranih klonov.	38
Slika 4.8:	PCR pomnožki plazmidne DNK izbranih klonov.	39
Slika 4.9:	Pomnožki šestnajstih klonov klamidijiskih genov za 16S rRNK pomnoženi z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r.	39
Slika 4.10:	DGGE analiza šestnajstih klonov klamidijiskih genov za 16S rRNA.	40
Slika 4.11:	Sekvence začetnih delov genov za 16S rRNK izbranih klonov v FASTA obliki.	42
Slika 4.12:	Poravnava sekvenc in izračun genetskih razdalj med njimi	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 3.1:	Seznam tkiv talnih členonožcev, iz katerih smo osamili skupno DNK.	14
Preglednica 3.2:	Seznam tkiv vretenčarskih vrst in aktivnega blata, iz katerih smo osamili skupno DNK.	15
Preglednica 3.3:	Sekvence v tem delu uporabljenih začetnih oligonukleotidov.	20
Preglednica 3.4:	PCR protokoli	21
Preglednica 4.1:	Primerjava učinkovitosti izolacije DNK štirih uporabljenih metod iz vzorcev črevesa laboda in kunca.	25
Preglednica 4.2:	Primerjava razmerij med nukleinskimi kislinami v vzorcih, izoliranih iz črevesa laboda in kunca, s štirimi različnimi metodami.	27
Preglednica 4.3:	Specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov.	33
Preglednica 4.4:	Vzorci, pri katerih smo s kombinacijo začetnikov, značilnih za skupino klamidij, uspešno pomnožili dele klamidijskih genov 16S rRNK.	36
Preglednica 4.5:	Seznam najpodobnejših sekvenc v bankah podatkov.	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{\max}	Maksimalna absorbanca
A_{260}	Absorbanca pri valovni dolžini 260 nm
bp	Bazni par
CTAB	Heksadecil (cetil) trimetil amonijev bromid
DGGE	Poliakrilamidna elektroforeza v denaturirajočem gradientu; angl. <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
dsDNK	Dvojnoverižna DNK
EDTA	Etilendiamin tetraacetna kislina; angl. <i>ethylenediaminetetraacetate</i>
PBS	Fosfatno zapufšana slana raztopina; angl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Verižna reakcija s polimerazo DNK; angl. <i>polymerase chain reaction</i>
RNK	Ribonukleinska kislina
rRNK	Ribosomska RNK
ssDNK	Enojnoverižna DNK
T_m	Temperatura tališča; angl. <i>melting temperature</i>
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
VNC	Živo, a se ne da gojiti; angl. <i>viable but not culturable</i>
μg	Mikrogram
μl	Mikroliter

1 UVOD

Z razvojem in uporabo molekularnih metod mikrobiologi odkrivajo vedno nove mikroorganizme. Tako so nedavno v prebavnem traktu kopenskih enakonožnih rakov opisali predstavnike doslej še neznane skupine klamidij, ki predstavlja samostojno evolucijsko vejo v redu *Chlamydiales*. Nedavno so odkrili še druge nove klamidije v žuželkah, obstaja pa tudi možnost, da je neznanih klamidij v drugih živalih, tako vretenčarjih, kot nevretenčarjih, še veliko. Vendar pa ni znano, kateri so še drugi možni gostitelji teh mikroorganizmov in kakšna je genetska pestrost skupin, ki jim omenjeni mikrobi pripadajo.

Znotrajcelični način življenja klamidij kaže na tesno povezanost bakterij in gostitelja. Ker sta gostitelj in simbiot tako tesno povezana, klamidij s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami ne moremo osamiti in gojiti v laboratorijskih razmerah. Zato smo se v nalogi odločili uporabiti direktne molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji in analizi nukleinskih kislin.

1.1 NAMEN NALOGE IN HIPOTEZE

Namen tega diplomskega dela je bil iz vzorcev različnih živali (predvsem iztrebkov ali delov prebavnega trakta nekaterih vretenčarjev in nevretenčarjev) osamiti skupno mikrobno DNK in z verižno reakcijo s polimerazo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ugotoviti, ali so v njih prisotne klamidijske sekvence. V kolikor bi takšne sekvence bile odkrite, smo jih nameravali filogenetsko preučiti in ugotoviti, ali gre za že znane ali nove filotipe.

Predvidevali smo, da bomo z izbranimi metodami odkrili klamidijske sekvence v izolirani DNK iz vzorcev tkiv talnih členonožcev, tkiv vretenčarskih vrst in aktivnega blata. Predvidevali smo tudi, da morebitne odkrite sekvence lahko pripadajo že znanim, ali pa popolnoma novim filotipom.

3 PREGLED OBJAV

3.1 METODE ZA ANALIZO MIKROBNE ZDRUŽBE

3.1.1 Tradicionalne mikrobiološke metode

V nasprotju z živalmi in rastlinami, je morfologija mikroorganizmov v splošnem preveč preprosta za uspešno klasifikacijo in identifikacijo. Zato je do nedavnega mikrobna identifikacija temeljila na izolaciji mikroorganizmov v čistih kulturah, čemur so sledili fiziološki in biokemijski testi. Identifikacija je bila torej zelo odvisna od zmožnosti kultivacije mikroorganizmov.

Znano je, da so v večini primerov mikroskopsko vidni mikroorganizmi v naravnih okoljih sposobni za življenje, vendar na trdih gojiščih ne tvorijo vidnih kolonij (Amann in sod., 1995). To je posledica neustreznih gojitvenih razmer, ki so običajno posledica nepoznavanja rastnih zahtev mikroorganizmov. Poleg tega so razlog za majhen odstotek mikroorganizmov, ki jih lahko gojimo, tudi različne mikrobne sintrofije v ekosistemih ter prehod v posebno fiziološko stanje, ki omogoča preživetje, ne pa tudi rast na gojiščih (t.i. VNC oblika; angl. *Viable but not culturable*) (Savage, 1995). Glavni vzrok za neprimernost tradicionalnih mikrobioloških metod pri analizi mikrobne združbe iz ekoloških vzorcev, tudi prebavil, je njihova dolgotrajnost in nezmožnost gojenja določenih mikroorganizmov, ki vodi do podcenjevanja dejanske mikrobne pestrosti (Savage, 1995).

3.1.2 Molekularne metode

Zaradi zgoraj navedenih pomankljivosti tradicionalnih mikrobioloških pristopov so v zadnjem desetletju prejšnjega tisočletja razvili učinkovite molekularne metode zasnovane na analizi nukleinskih kislin, ki so se izkazale uporabne za hitro in specifično odkrivanje mikroorganizmov neposredno v naravnih vzorcih in mešanih kulturah ter za preučevanje strukture mikrobne združbe v smislu bogatosti in pestrosti (Wen-Hsiung in Graur, 1990).

Med najbolj primernimi geni za preučevanje mikroorganizmov so se izkazali predvsem geni za ribosomsko RNK (rRNK), zlasti gena za molekulo 5S rRNA iz večje in 16S rRNK iz manjše ribosomske podenote (Olsen in sod., 1986; Olsen in Woese, 1993). Čeprav sta se obe molekuli izkazali za koristni, v determinativnih, ekoloških in filogenetskih študijah običajno uporabljajo molekule 16S rRNK predvsem zaradi obsežnejše informacije, ki jo vsebujejo. Kljub temu, da analiza genov za rRNK predstavlja gojitveno neodvisno alternativo tradicionalnim tehnikam za identifikacijo mikroorganizmov, pa ne more povsem nadomestiti izolacije in karakterizacije fizioloških parametrov pri opisih novih vrst mikroorganizmov (Amann in sod., 1995).

Primernost uporabe sekvenc 16S rRNK molekul za analizo mikroorganizmov v njihovih naravnih okoljih je tudi vzrok in istočasno posledica hitrega kopičenja ribosomskih sekvenc v javno dostopnih podatkovnih zbirkah, kot so EBI (European Bioinformatic Institute), RDP (Ribosomal Database Project) in GenBank (National Centre for Biotechnology Information). Te podatkovne zbirke omogočajo primerjalno analizo vzorcev z že deponiranimi sekvencami ter predhodno *in silico* analizo sekvenc za izdelavo začetnih oligonukleotidov (Amann in sod., 1995).

Sočasno z razvojem molekularne filogenije je prišlo do razvoja metod, ki so premostile večino težav tradicionalnih mikrobioloških metod pri raziskavah prokariontov v njihovih naravnih okoljih. Tako je verižna reakcija s polimerazo (PCR) omogočila pomnoževanje delov DNK neposredno iz vzorcev iz okolja, ter s tem zagotovila primerne količine nukleinskih kislin za njihovo preučevanje. Metode molekulskega kloniranja, ter gelska elektroforeza z denaturacijskim (DGGE) in temperaturnim gradientom (TGGE) so omogočile podrobnejše preučevanje pomnožkov PCR (Kostanjšek, 2002), postopki sekvenciranja pa ugotavljanje njihovega nukleotidnega zaporedja. Slednje je osnova za filogenetsko analizo in sintezo specifičnih oligonukleotidnih sond, ki s hibridizacijskimi tehnikami omogočajo zaznavo sekvenc v preučevanih mikroorganizmih *in situ*.

3.1.2.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE; angl. *denaturing gradient gel electrophoresis*)

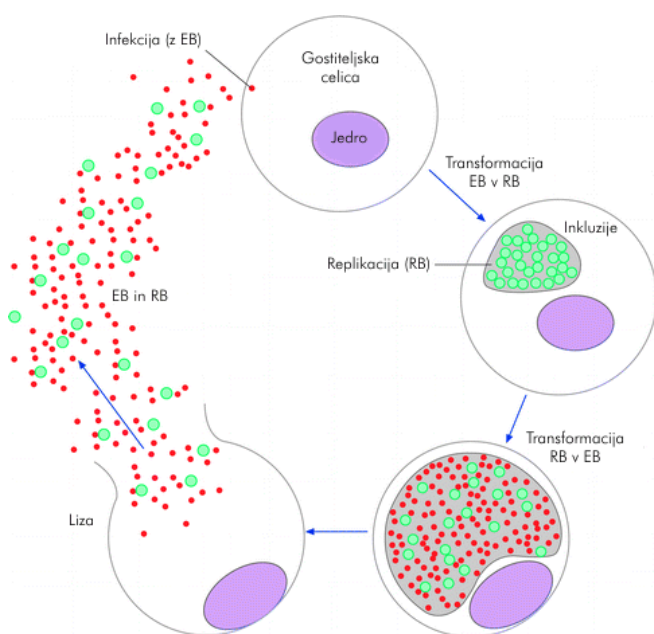
Populacijski dinamiki mikrobnih združb, ki je pomemben vidik mikrobne ekologije, lahko sledimo s hibridizacijskimi tehnikami in s kvantitativnimi različicami PCR reakcije. V zadnjih letih za analizo genetske pestrosti celotne združbe, ali posameznih populacij ter za hitro sledenje sprememb v mikrobnih združbah vse bolj uporabljamo metodi DGGE in TTGE. S tema tehnikama lahko ločimo enako dolge pomnožke PCR z različnimi sekvencami. Teoretično lahko zaznamo celo razlike v enem samem nukleotidu. Ločitev pomnožkov z omenjenima metodama temelji na zmanjšanju elektroforetske mobilnosti delno denaturirane dsDNK molekule v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje linearni gradient denaturanta (mešanica uree in formamida) pri DGGE oziroma linearni temperaturni gradient pri tehniki TTGE. Ko DNK domena z najnižjo temperaturo tališča (T_m) (angl. *high melting domain*) doseže svojo T_m na določenem mestu v denaturirajočem gelu, se vijačnica razklene in migracija molekule se praktično ustavi. Razlike v sekvenci znotraj teh domen pomenijo razlike v T_m , zato se DNK molekule z razlikami v sekvenci ustavijo na različnih mestih v gelu (Muyzer in Smalla, 1998; Muyzer in sod., 1993; Muyzer, 1999).

Z uporabo DGGE metode in njenih različic lahko zaznamo do 50 % razlik v sekvencah DNK dolžine do 500 baznih parov. Občutljivost metode izredno povečamo z uporabo začetnih oligonukleotidov z 'GC-čeljustmi': daljšim zaporedjem gvaninskih in citozinskih nukleotidov na 5' koncu enega od začetnih oligonukleotidov uporabljanih pri reakciji PCR (Myers in sod., 1985). Omenjena sekvenca GC-čeljusti je običajno dolga od 30 do 50 nukleotidov in deluje kot DNK domena z visoko T_m , ki med elektroforezo preprečuje, da bi se dsDNK molekula popolnoma ločila na dve verigi. Taljenje DNK fragmenta brez GC-čeljusti ne vodi do nastanka stabilnih, delno razprtih molekul, ampak se nadaljuje do popolne disociacije, po kateri vsaka od nastalih enojnoverižnih DNK (ssDNK) molekul potuje s svojo hitrostjo (Ferme, 2003).

2.2 KLAMIDIJE

2.2.1 Biologija klamidij

Klamidije so po Gramu negativne, obligatne znotrajcelične bakterije z dvofaznim razvojnim življenjskim ciklom. Infektivna in metabolno neaktivna elementarna telesa velika 0,2 do 0,5 μm v premeru se pritrdijo na površino gostiteljske celice, vanjo pa vstopijo z indukcijo endocitoze gostiteljske celice. Elementarna telesa v membransko vezanih vakuolah v citoplazmi celice se spremenijo v metabolno aktivna retikularna telesa. Ta so v premeru velika 0,5 do 1,5 μm . Delijo se z binarno cepitvijo in tvorijo intravakuolne mikrokolonije, ki jih imenujemo klamidijski vključki. Retikularna telesa v vakuoli se sčasoma pretvorijo v elementarna telesa, ki se sprostijo iz gostiteljske celice in okužijo sosednje celice ali pa zapustijo telo gostitelja. Cikel je končan v 36 do 96 urah, odvisno od vrste (Corsaro in sod., 2003).



Slika 2.1: življenjski cikel klamidij; infektivna elementarna telesa so obarvana rdeče, večja, replikativna retikularna telesa pa zeleno. EB = elementarno telo, RB = retikularno telo. (The chlamydial... , 2005)

2.2.2 Taksonomija redu *Chlamydiales*

V red *Chlamydiales* so uvrščene znotrajcelične bakterije s kompleksnim razvojnim ciklom in vsaj 80-odstotno podobnostjo z geni za 16S in/ali 23S rRNK drugih bakterij iz rodu *Chlamydiales* (Everett in sod., 1999). Red je bil še do nedavnega zastopan le z družino *Chlamydiaceae* z edinim rodom *Chlamydia*, v katerega so bile združene štiri vrste, opisane v vretenčarskih gostiteljih (Moulder, 1984). Uporaba molekulske biološke pristopov v zadnjem desetletju je razkrila prisotnost klamidijam sorodnih bakterij v različnih okoljih (Amann in sod., 1997; Horn in sod., 2000; Horn in Wagner, 2001; Thao in sod., 2003; Kostanjšek in sod., 2004; Corsaro in Venditti, 2004; Collingro in sod., 2005) in s tem upravičila potrebo po novi taksonomski ureditvi redu. Tako je red *Chlamydiales* trenutno razdeljen na družine *Waddliaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* in *Chlamydiaceae*. Slednja, največja in s kliničnega vidika najpomembnejša družina, združuje klamidije vretenčarskih gostiteljev in je razdeljena na rodova *Chlamydia* s tremi in *Chlamydophila* s šestimi vrstami (Everett in sod., 1999).

Kljub temu, da so raznolikost klamidijskih gostiteljev nakazovale že številne morfološke značilnosti povzročiteljev znotraj celičnih okužb v tkivih rib (Groff in sod., 1996; Crespo in sod., 1999), plazilcev (Jacobson in Telford, 1990; Homer in sod., 1994) in nevretenčarjev (O'Brien in MacLeod, 1983; Harshbarger in sod., 1977; Osaki, 1973; Morel, 1976), je šele razvoj dostopnih in uporabnih molekularnih tehnik v zadnjem desetletju omogočil vpogled v dejansko raznolikost klamidij v naravnih okoljih. Tako je danes poznanih nekaj sto sekvenc genov za rRNK izoliranih iz različnih okolij (Corsaro in sod., 2003), ki jih lahko zaradi njihove podobnosti z znanimi klamidijskimi taksoni in filogenetskega položaja uvrščamo v red *Chlamydiales*.

Z uporabo širše specifičnih klamidijskih začetnih oligonukleotidov v PCR reakcijah in drugih molekularnih orodij so tako potrdili prisotnost klamidij, kot so na primer pripadniki rodov *Waddlia* in *Simkania*, v različnih kliničnih vzorcih vretenčarjev in ljudi (Osserwaarde in Meijer, 1999). Te klamidije so možni povzročitelji okužb dihal, urogenitalnega trakta, oči, krvožilja in med drugim tudi rodil, kar vodi v abortus in smrt zarodka (Corsaro in sod., 2003; Corsaro in Venditti, 2004).

Poleg kliničnih vzorcev so klamidijske sekvence odkrili tudi v okoljskih vzorcih, ki pa so, razen morda rizosfere (Schmalenberger in Tebbe, 2002), praviloma vezani na vodno okolje. Tako so na primer znane sekvence genov za 16S rRNK sorodne klamidijskim iz vzorcev aktivnega blata čistilne naprave, sedimentov slanega antarktičnega jezera in zbiralnikov pitne vode (Corsaro in sod., 2002).

Kot pomemben naravni rezervoar klamidij so se izkazali enocelični organizmi, zlasti amebe (Horn in sod., 1999; Horn in sod., 2000; Amann in sod., 1997). Poleg vpogleda v vrstno pestrost klamidij je pomembna značilnost teh klamidijskih gostiteljev dejstvo, da vsaj nekatere klamidije v teh gostiteljih lahko gojimo *in vitro*, kar je sicer glavna ovira pri preučevanju znotraj celičnih mikroorganizmov. Gojenje klamidij v amebah je tudi zadovoljilo pogoju za opis novih bakterijskih vrst, kar je botrovalo opisu novih klamidijskih taksonov, kot sta na primer rodova *Neochlamydia* (Horn in sod., 2000) in *Parachlamydia* (Amann in sod., 1997). Poleg tega prosto živeče amebe omogočajo tudi gojenje klamidij iz nekaterih drugih okolij (Kahne in sod., 2001; Collingro in sod., 2005), kar omogoča intenzivnejše raziskave okoljskih klamidij.

2.2.3. Klamidije kot povzročitelji okužb pri vretenčarjih

Klamidije so pomembni patogeni, saj povzročajo različne bolezni pri različnih vretenčarjih in človeku (Corsaro in sod., 2003). Klamidije lahko povzročajo respiratorne (*Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila trachomatis*, *Chlamydophila pecorum*, *Parachlamydia achantamoebae* in *Simkania negevensis*), očesne (*C. trachomatis*, *C. pecorum*, *C. psittaci*,...) in urogenitalne okužbe (*C. suis*, *C. pecorum*, *C. abortus*,...), splav (*C. abortus*, *C. felis*, *Waddlia chondrophila*,...), kardiovaskularne bolezni (*C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. abortus*,...) in bolezni centralnega živčnega sistema (CŽS), kot so klamidijski meningitis oziroma encefalitis, kronične bolezni CŽS in amebijski encefalitis (*C. psittaci*, *C. pneumoniae*,...).

Klamidije, kot novo pojavljajoči patogeni pri ljudeh: *Chlamydophila pneumoniae* (ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen, Multipla skleroza, endokarditis), *Chlamydophila abortus* (gestacionalna psitakoza), *Parachlamydia achantamoebae* (respiratorne okužbe),

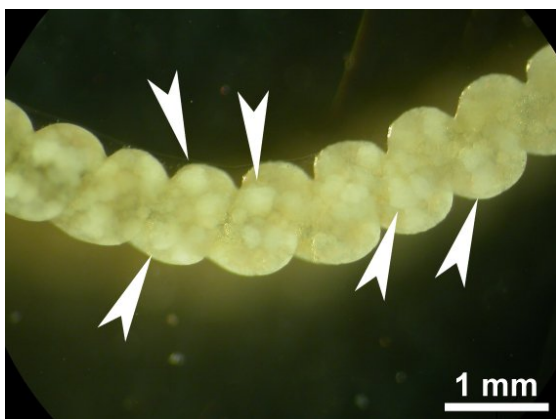
Simkania negevensis (bronhitis pri otrocih in pljučnica pri odraslih),... In klamidije kot novo pojavljajoči patogeni pri živalih: *Waddlia chondrophila* (splav pri govedu), *Parachlamydiaceae* (sistematska paraklamidoza pri plazilcih), *Chlamydophila pneumoniae* (letalna sistemska infekcija pri žabah) in *Chlamydiaceae sp.* (epiteliocistis pri ribah, sistemska klamidoza pri plazilcih) (Corsaro in sod., 2003)

2.2.4 Klamidijske okužbe nevretenčarjev

Zveza med klamidijami in členonožci se je do nedavnega zdela redka in malo pomembna. Kljub temu so bili nedavno opisani štirje novi klamidijski povzročitelji znotrajceličnih okužb členonožcev. Prvi sta predstavnika rodu *Rhabdochlamydia*, in sicer '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', opisan pri kopenskem raku enakonožcu *Porcellio scaber* (Kostanjšek in sod., 2004), ter '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*', ki povzroča okužbo tkiv ščurka *Blatta orientalis* (Corsaro in sod., 2006). Drugi dve pa sta *Fritschea bemesiae* in *F. eriococci* (Thao in sod., 2003; Everett in sod., 2005) odkriti pri enakokrilih. Slednji se uvrščata v družino *Simakniaceae*, medtem ko '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' in '*Candidatus R. crassificans*' tvorita samostojno družino *Rhabdochlamydiaceae*, ki je sestrska družini *Simkaniaceae*.

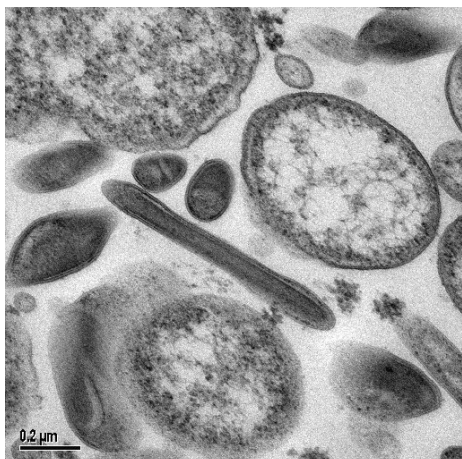
Kljub temu, da so vsi navedeni povzročitelji rodov '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' in *Fritschea* zaradi nezmožnosti gojenja v čisti kulturi razporejeni v začasno kategorijo '*Candidatus*' (Murray in Stackebrandt, 1995), pa to ne zmanjšuje pomena členonožcev kot zelo verjetnega rezervoarja klamidijskih okužb. Ob upoštevanju koevolucije znotrajceličnih bakterij z gostiteljskimi organizmi so členonožci zaradi svoje raznolikosti in številčnosti celo največji potencialni naravni rezervoar klamidij. Raznolikost naravnih rezervoarjev zagotavlja obstoj bakterij in hkrati razvoj in selekcijo njihovih virulenčnih dejavnikov (Corsaro in sod., 2003). Ob dejstvu, da bi morali biti vsi klamidijski organizmi obravnavani kot potencialni patogeni za vretenčarje (Corsaro in Venditti, 2004), se tako kaže vedno večja potreba po poznavanju raznolikosti klamidij in njihovih potencialnih gostiteljev.

'*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' povzroča okužbo notranjih orgnov, zlasti prebavnih žlez kopenskega enakonožca *Porcellio scaber*. Okužba se kaže kot velike znotrajcelične kolonije bakterij v okuženih celicah, ki so v primeru prebavnih žlez vidne kot bele pike, vidne s prostim očesom (slika 2.2).



Slika 2.2: okužene prebavne žleze kopenskega enakonožca *Porcellio scaber* (z dovoljenjem doc. dr. Roka Kostanjška).

Iz okuženih celic se elementarna telesa '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' sproščajo v notranjost cevaste prebavne žleze, pri čemer prihaja do hudih poškodb gostiteljevih celic. Kljub temu pri okuženih živalih ni bilo opaziti izrazite smrtnosti, kar potrjuje vlogo enakonožca kot naravnega rezervoarja omenjenih klamidij (Kostanjšek in sod, 2004). Morfološka značilnost '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' so elementarna telesa s pet-slojno celično steno in za klamidije nenavadno paličasto obliko, po kateri je rod tudi dobil ime (slika 2.3). Opisana morfologija elementarnih telesc je zanjilna tudi za bakterije '*Candidatus R. crassificans*' opisane pri ščurkih vrste *Blatta orientalis*, pri katerih prav tako kot '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' povzročajo okužbe notranjih organov, zlasti maščobnih telesc, ki ob okužbi izrazito otečejo (Corsaro in Venditti, 2004; Corsaro in sod., 2006).



Slika 2.3: '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' v vakuolah celic hepatopankreasa pri enakonožnem raku *Porcellio scaber*; podolgovata, paličasto oblikovana elementarna telesca so morfološka posebnost pri '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (z dovoljenjem doc. dr. Roka Kostanjška).

2.2.5 Iskanje možnih gostiteljev

Študije molekularne epidemiologije in upoštevanje porazdelitve in raznolikosti klamidij v različnih habitatih pomagajo pri identifikaciji gostiteljskih vrst in preučevanju poti prenosa. Taka preučevanja so tesno povezana s tistimi, ki preučujejo možno patogeno vlogo nove klamidije.

Npr. nekateri avtorji pravijo, da mišice školjk igrajo pomembno vlogo kot vektorji za klamidije. V tem primeru lahko povezava med klamidijami v školjkah in obalnimi pticami predstavlja možnost prenosa klamidij iz školjk na ptice in nato potencialno na človeka (Corsaro in sod., 2003). Tudi '*Candidatus R. crassificans*' se lahko izkaže za patogenega za ljudi, zaradi česar lahko iztrebki ščurkov, okuženih s to bakterijo, povzročijo ogromne epidemiološke posledice (Corsaro in sod., 2006).

Pri klamidijah za prenos okužbe ni potreben vmesni gostitelj, ker se med gostitelji prenašajo neposredno. Čeprav nekatere klamidije lahko prehajajo med gostitelji različnih živalskih skupin, je primarni gostitelj določene vrste klamidij, v katerem se ta zadržuje tudi brez bolezenskih znakov, pomemben taksonomski znak v sistematiki klamidij (Kostanjšek, 2002).

2.3 NAČRT DELA

- Izolacija skupne mikrobne DNK:

Z namenom ugotoviti, katera metoda je najbolj primerna za izolacijo skupne mikrobne DNK iz živalskih vzorcev, smo preizkusili in primerjali štiri različne metode izolacije: metodo s proteinazo K, SDS in CTAB, metodo s krogličnim stresalcem in CTAB (»beadbeater«), metodo z ultrazvokom in CTAB in metodo s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB.

- Merjenje koncentracije izolirane mikrobne DNK:

Za ugotavljanje količine in kvalitete izolirane DNK smo merili absorbanco izoliranih nukleinskih kislin pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm.

- Preverjanje primernosti izolirane DNK za nadaljnje molekularno biološke manipulacije:

Primernost izolirane DNK za molekularno biološke analize, uporabljene v nalogi, smo ugotavljali na podlagi učinkovitosti pomnoževanja dela bakterijskih genov za 16S rRNK, ter ločevanja tako dobljenih pomnožkov z DGGE.

- Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR):

Najprej smo ugotavljali, ali lahko iz DNK, izolirane iz vseh opisanih vzorcev (preglednici 3.1 in 3.2), namnožimo del gena za 16S rRNK z začetnima oligonukleotidoma F968 in R1401. V naslednjem koraku pa smo ugotavljali, ali lahko z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r v preučevanih vzorcih uspešno pomnožimo dele klamidijevih genov 16S rRNK in s tem potrdimo njihovo prisotnost v vzorcih.

- Analiza PCR pomnožkov: DGGE ali kloniranje/sekvenciranje in sekvenčna analiza:

Da bi potrdili pravo identiteto PCR pomnožkov, ki smo jih namnožili z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r, smo dva izbrana pomnožka ločili z molekulskim kloniranjem. Klone smo analizirali z DGGE in nato gene za 16S rRNK izbranih klonov sekvencirali. Na koncu smo še analizirali sekvenčne podatke, in sicer tako,

da smo dobljenim sekvencam z algoritmom BlastN poiskali najbolj podobne sekvence v bazah podatkov ter sekvence med seboj primerjali s programom ClustalX .

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci

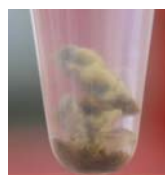
Tkiva vretenčarjev smo dobili od dr. Alenke Dovč, ki jih je odvzela ob veterinarskih pregledih na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani. Tkiva predstavnikov talnih členonožcev je s seciranjem za nas pripravil doc. dr. Rok Kostanjšek z oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, aktivno blato pa je iz centralne čistilne naprave Domžale – Kamnik.



Vzorec 14



Vzorec 23



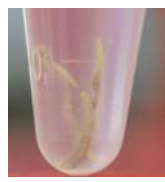
Vzorec 29



Vzorec 31



Vzorec 32



Vzorec 33

Slika 3.1: Primeri vzorcev tkiv talnih členonožcev.

Preglednica 3.1: Seznam tkiv talnih členonožcev, iz katerih smo osamili skupno DNK.

oznaka	skupina	vrsta	del živali	masa vzorca (g)
1	pajkovci (Arachnida), pajki (Araneae)	<i>Trochosoa terricola</i>	zadek	0,0169
4	pajkovci (Arachnida), pajki (Araneae)	<i>Trochosoa terricola</i>	zadek	0,0183
5	pajkovci (Arachnida), pajki (Araneae)	<i>Dysdera ninnii</i>	zadek	0,078
6	pajkovci (Arachnida), pajki (Araneae)	<i>Dysdera ninnii</i>	zadek	0,0328
9	pajkovci (Arachnida), pajki (Araneae)	<i>Pterinochillus murinus</i>	zadek	0,1497
10	žuželke (Insecta), ravnokrilci (Orthoptera)	<i>Achaeta domesticus</i>	črevo	0,0341
11	žuželke (Insecta), ravnokrilci (Orthoptera)	<i>Achaeta domesticus</i>	črevo	0,0434
14	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Titanetes albus</i> ^a	črevo + hepatopankreas	0,0239
16	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Asellus aquaticus</i>	zadnje črevo	0,069
17	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Asellus aquaticus</i>	hepatopankreas	0,0287
18	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Asellus aquaticus</i>	zadnje črevo	0,0176
19	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Asellus aquaticus</i>	hepatopankreas	0,0205
21	stonoge (Myriapoda), dvojnonoge (Diplopoda)	<i>Julus</i> sp.	črevo	0,0223
23	stonoge (Myriapoda), dvojnonoge (Diplopoda)	<i>Polydesmus</i> sp.	črevo	0,0151
24	stonoge (Myriapoda), strige (Chilopoda)	<i>Lithobius</i> sp.	črevo	0,0496
25	raki (Crustacea), postranice (Amphipoda)	<i>Gammarus</i> sp. ^a	cela žival	0,0308
26	raki (Crustacea), postranice (Amphipoda)	<i>Niphargus</i> sp. ^a	cela žival	0,0226
27	raki (Crustacea), postranice (Amphipoda)	<i>Niphargus</i> sp. ^a	cela žival	0,0793
29	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Armadillidium vulgare</i>	črevo + hepatopankreas	0,058
31	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Porcellionides prunosus</i>	črevo + hepatopankreas	0,0259
32	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Porcellio scaber</i>	črevo	0,0155
33	raki (Crustacea), enakonožci (Isopoda)	<i>Porcellio scaber</i>	hepatopankreas	0,0158

a - jamska žival

Preglednica 3.2: Seznam tkiv vretenčarskih vrst in aktivnega blata, iz katerih smo osamili skupno DNK.

oznaka	vrsta	slovensko ime	uporabljeni del živali	masa vzorca (g)
Ss	<i>Accipiter nisus</i>	skobčevka	slepo črevo	0,1821
Sd	<i>Accipiter nisus</i>	skobčevka	debelo črevo	0,10655
K	<i>Buceros vigil</i>	kljunorožec	sveže blato	0,29215
G(1.)	<i>Elaphe quatuorlineata</i>	navadni gož	črevesje	0,17855
J	<i>Erinaceus concolor</i>	beloprski jež	blato	0,11045
Ps	<i>Python regius</i>	kraljevi piton	slepo črevo	0,0738
Pb	<i>Python regius</i>	kraljevi piton	blato	0,06325
Hs	<i>Phodopus songorus</i>	ruski hrček	slepo črevo	0,1443
Hd	<i>Phodopus songorus</i>	ruski hrček	debelo črevo	0,08385
V	<i>Sciurus vulgaris</i>	navadna veverica	blato	0,3382
M	<i>Vipera ammodytes</i>	modras	blato+črevo	0,2427
KA	<i>Casuarius casuarius</i>	kazuar	črevo	0,2711
Mis	<i>Mus musculus</i>	miš	slepo črevo	0,0803
Mid	<i>Mus musculus</i>	miš	debelo črevo	0,1528
N	<i>Struthio camelus</i>	noj	blato	0,2017
PE	<i>Cynomys</i> sp.	prerijski pes	črevo + blato	0,156
Zs	<i>Lepus europaeus</i>	divji zajec	slepo črevo	0,1839
Zd	<i>Lepus europaeus</i>	divji zajec	debelo črevo	0,3502
L	<i>Iguana iguana</i>	zeleni legvan	slepo črevo	0,1751
G(2.)	<i>Elaphe quatuorlineata</i>	navadni gož	črevesje	0,17855
Ls	<i>Cygnus olor</i>	črni labod	črevo+blato ^s	0,376
Ks	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	kunec	slepo črevo ^s	0,269

AB		aktivno blato		0,5832 / 600μL
AB+TE		aktivno blato	AB + pufer TE	100μL

s - vzorec homogeniziran z ultrazvokom

3.1.2 Kompleti

Za kloniranje pomnožkov verižne reakcije s polimerazo smo uporabili Inst/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Kanada).

Za izolacijo in čiščenje nukleinskih kislin iz gela smo uporabili QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Frankfurt, Nemčija).

Za izolacijo plazmidne DNK smo uporabili High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)

Za čiščenje PCR pomnožkov pa smo uporabili High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)

3.1.3 Pufri in raztopine

IME	SESTAVA
pufer TE, pH 8.0	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
pufer PBS, pH 7.4	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
CTAB/NaCl	10 % (ut.) heksadeciltrimetil amonijev bromid 0.7 M NaCl
pufer TAE 1x	0,04 M Tris-acetat 0,001 M EDTA, pH 8.0
pufer TBE 0,5x	0,045 M Tris-borat 0,001 M EDTA, pH 8.0
SDS	10 % (ut.) Na-dodecil sulfat

3.1.4 Gojišča

Klone *E. coli* sev TOP10, ki smo jih dobili v postopku kloniranja PCR pomnožkov smo gojili v tekočem LB-Amp gojišču.

Priprava:

Pripravili smo tekoče LB gojišče, ki smo ga po avtoklaviranju pustili, da se je ohladilo na sobno temperaturo ter mu dodali antibiotik ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml. Gojišče smo sterilno razlili v 5 ml alikvotih v sterilne steklene epruvete s pokrovčki.

Recept za pripravo enega litra LB gojišča (*Luria-Bertani Medium*) (pH 7,0):

950 ml destilirane vode

10 g triptona

5 g kvasnega ekstrakta

10 g NaCl

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija skupne mikrobne DNK

3.2.1.1 Metoda s proteinazo K, SDS in CTAB (Ausubel in sod., 1999)

Vzorci smo homogenizirali z ročnim steklenim homogenizatorjem in pri tem spirali s pufrom TE. Nato smo jih centrifugirali pri 7000 x g 5 minut, odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 567 µl pufru TE. Raztopini smo dodali 3 µl proteinaze K (20 mg/ml) in 30 µl 10-odstotnega SDS. Po enourni inkubaciji pri 37 °C smo raztopini dodali 100 µl 5 M NaCl, premešali in dodali še 80 µl 10-odstotnega heksadeciltrimetilamonijevega bromida (CTAB) v 0,7-odstotnem NaCl, segretega na 65 °C. Mešanico smo inkubirali 10 minut pri 65 °C. Po inkubaciji smo ekstrahirali nukleinske kisline v vzorcu z enakim volumnom kloroforma in po 10-minutnem centrifugiranju pri 12.000 x g prenesli zgornjo vodno fazo v svežo centrifugirko, ter ponovili ekstrakcijo z enakim volumnom mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1). Po ponovnem 10-minutnem centrifugiranju pri 12.000 x g smo v vodni fazi raztopljene nukleinske kisline oborili z dodatkom 0,6-kratnega volumna izopropanola. Po 15-minutnem centrifugiranju pri 14.000 x g smo supernatant previdno odstranili, usedlino in stene centrifugirke pa sprali z 1 ml 70-odstotnega ledeno hladnega etanola. Po 10-minutnem centrifugiranju pri 14.000 x g smo supernatant odstranili, nukleinske kisline v usedlini pa posušili na zraku in jih raztopili v 35 µl 10 mM pufru TE.

3.2.1.2 Metoda s krogličnim stresalcem in CTAB

Po 5-minutnem centrifugiranju ročno homogeniziranih vzorcev pri 7.000 x g smo bakterijske celice in delce tkiv v usedlini raztopili v 800 µl pufru TE. To smo prenesli v centrifugirke z 1,2 g mešanice sterilnih cirkonij-silikatnih kroglic premera 0,5 mm in 0,1 mm (Biospec Products, Bartsville, ZDA), ter vzorce stresali v stresalcu (Mini-beadbeater

3110BX, Biospec Products, Bartsville, ZDA) 3 x po 60 sekund, vmes pa hladili 1 minuto na ledu. Po obdelavi s stresalcem smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g. 600 µl supernatanta smo prenesli v sveže centrifugirke, mu dodali 5 M NaCl in 10-odstotni CTAB, ter ekstrahirali nukleinske kisline, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1.



Slika 3.2: Kroglični stresalec (Mini-beadbeater ..., 2006).

3.2.1.3 Metoda z ultrazvokom in CTAB

Vzorce smo homogenizirali kot je opisano v poglavju 3.2.1.1. Večje vzorce smo raztopili v 1,5 ml TE in centrifugirali 10 minut pri 14.000 x g. Supernatant smo zavrgli, usedlini pa dodali dodali 1,5 ml pufra TE. 600 µl smo prenesli v novo centrifugirko, ostalo pa smo shranili. Manjše vzorce smo po homogenizaciji centrifugirali 5 minut pri 7.000 x g, odstranili supernatant in resuspendirali v 600 µl TE. Vzorce smo nato dodatno homogenizirali z ultrazvokom v sonikatorju Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA), s tremi cikli po 30 sekund. Homogenizat smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g. Supernatant smo prenesli v novo centrifugirko, mu dodali 5 M NaCl in 10-odstotni CTAB v 0,7-odstotnem NaCl, ter ekstrahirali nukleinske kisline, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1.



Slika 3.3: Ultrazvočni razbijalec celic Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (MSE Soniprep... , 2001)

3.2.1.4 Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB

Po 5-minutni centrifugaciji homogeniziranih vzorcev pri 7.000 x g smo bakterijske celice in delce tkiv v usedlini raztopili v 567 μ l pufru TE. Vzorce smo nato homogenizirali v ultrazvočnem razbijalcu celic, kot je opisano v poglavju 3.2.1.3. Tako obdelanim vzorcem smo dodali 3 μ l proteinaze K (20 mg/ml) in 30 μ l 10-odstotnega SDS. Po enurni inkubaciji pri 37°C smo raztopini dodali 5 M NaCl, in 10-odstotni CTAB v 0,7-odstotnem NaCl, ter ekstrahirali nukleinske kisline, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1

3.2.2 Merjenje koncentracije izolirane mikrobne DNK

Absorbanco izoliranih nukleinskih kislin smo merili pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm v spektrofotometru UV-160A spektrofotometer (Shimadzu Corporation, Japonska). Absorbanco ustrezno redčene DNK smo merili v kvarčnih kivetah (Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim, Nemčija) z dolžino optične poti 10mm. Kot referenčno vrednost, ki predstavlja šum ozadja, smo uporabili raztopino pufru TE (pH 8,0). Praktično pravilo za izračunavanje koncentracije DNK v vzorcu s pomočjo vrednosti A_{260} je takšno, da 1 enota A_{260} ($A_{260}=1$) ustreza 50 μ g/ml dvoverižne DNK, kar pa velja le v primeru, da je vzorec DNK čist, oziroma da je razmerje A_{260}/A_{280} med 1,7 in 2,0.

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

Za namnoževanje dela genov za 16S rRNK s PCR smo uporabili ciklični sistem My cycler™, thermal cycler (BioRad, ZDA). Reakcijske mešanice smo pripravili v 200 µl mikrocentrifugirkah (MicroAmp, Perkin Elmer, ZDA).

Preglednica 3.3: Sekvence v tem delu uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

začetni oligonukleotid	sekvenca	tarčno mesto v genu za 16 S rRNK	vir
Eub338	5' - ACT CCT ACG GGA GGC AGC	338-355	Amann in sod., 1995
534	5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG		Medlin in sod.
F968	5' - AA CGC GAA GAA CCT TAC - 3'	968-984	Nübel in sod., 1996
R1401	5' - CGG TGT GTA CAA GAC CC - 3'	1385-1401	Nübel in sod., 1996
CHL_16S(20)f	5' - GCG TGG ATG ARG CAT GCA A 3' ^a	na začetku gena	To delo ^e
CHL_16S(1300)r	5' - CCATGATGTGACGGGCGG - 3' ^b	Okrog mesta 1300	Everett in sod., 1999
CHL_16S(270)f	5' - GAC GTC TAG GCG GRY TGA GAG - 3' ^{a,c}	Okoli 270	To delo ^f
CHL_16S(530)r	5' - GWA TTA CCG CRG CKG CTG - 3' ^d	522-539	To delo ^g
CHL_16S(270)r_dgge	5' - cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc ggc ccg ccg ccg ccg ccg cGA CGT CTA GGC GGR YTG AGA G - 3'	Okoli 270	To delo ^h
CHL_16S(530)r_dgge	5' - gcg gcg gcg gcg gcg ggc cgg gcg cgg ggc gcg gcg ggc gGW ATT ACC GCR GCK GCT G - 3'	522-536	To delo ⁱ
M13 uni (-21)	5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'	-	J
M13 rev (-29)	5' - CAG GAA ACA GCT AGT ACC - 3'	-	J

a - R = G ali A (puRine)

b - reverzni komplement začetnega oligonukleotida 16SF2 (Everett in sod., 1999)

c - Y = C ali T (pYrimidine)

d - W = A ali T (Weak interaction (2 H bonds)); K = G ali T (Keto)

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>)

e - modificiran začetni oligonukleotid 16SF

(http://www.chlamydiae.com/restricted/docs/Methods/tech_speciation_pcr.asp)

f - modificiran reverzni komplement začetnega oligonukleotida CHL16SREV1 (Ossewaarde and Meijer, 1999)

g - modificiran začetni oligonukleotid Universal2 (Liu in sod., 2001)

h - modificiran začetni oligonukleotid CHL16SREV1 (Ossewaarde and Meijer, 1999) z dodano GC čeljustjo

i - modificiran začetni oligonukleotid Universal2 (Liu in sod., 2001) z dodano GC čeljustjo

j - standardni sekvencijski začetni oligonukleotid

20 µl reakcijske mešanice so vsebovale 2 µl PCR pufra, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mešanico deoksinukleotidov (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 enoto rekombinantne *Taq* polimeraze DNK (vse Fermentas MBI), 10 pmol vsakega začetnega oligonukleotida in 1 µl ustrezno redčene DNK. Volumen reakcijske mešanice smo dopolnili s sterilno vodo (Sigma) do 20 µl.

preglednica 3.4: PCR protokoli

Ime protokola	Začetni oligonukleotid (k 3')	Začetni oligonukleotid (k 5')	Dolžina produkta (cca. bp)	Trajanje začetne denaturacije pri 94 °C (min)
1. Univ 1 dgge	Eub338dgge	534dgge	200	3
2. Univ 2	F968	L1401	430	3
3. CHL	CHL 16S(270)f	CHL 16S(530)r	260	3
4. CHL dgge 1	CHL 16S(270)f dgge	CHL 16S(530)r	260	3
5. CHL dgge 2	CHL 16S(270)f	CHL 16S(530)r dgge	260	3
7. kloni	CHL 16S(270)f	CHL 16S(530)r	260	10
8. plazmidi	M13uni(-21)	M13rev(-29)	330	3

Število ciklov	Trajanje denaturacije pri 94 °C (s)	Prileganje temp. / čas (°C / s)	Trajanje polimerizacije pri 72 °C (s)	Trajanje podaljšane polimerizacije pri 72 °C (min)
35	45	56 / 30	20	10
25	45	56 / 30	80	12
30	30	56 / 30	40	5
30	30	56 / 30	40	5
30	30	56 / 30	40	5
25	30	56 / 30	40	5
30	60	55 / 60	90	10

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Za preverjanje učinkovitosti izolacije DNK ter za odkrivanje in ločevanje PCR pomnožkov smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili s segrevanjem 1-odstotne raztopine agaroze v 0,5 x pufri TBE, polimerizacija gela pa je potekala pri sobni temperaturi. Elektroforeza je potekla v pufri 0,5 x TBE pri napetosti 5 do 7 V/cm. Po končani elektroforezi smo gele 10 minut barvali v raztopini etidijevega bromida s koncentracijo 1 µg/ml, sledilo je 15-minutno razbarvanje v vodi. Nekatere gele smo barvali tudi s SYBR gold (Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, Molecular Probes). Gele barvane z etidijevim bromidom smo presvetljevali s kratkovalovno svetlobo

v transiluminatorju Gel Doc 1000 (BioRad, Hercule, ZDA), nadgrajenim s sistemom za zajemanje in obdelavo slike molecular Analyst 1,4 (BioRad, Hercule, ZDA), gele barvane s SYBR gold pa z aparatom Chemi Genius2 (Bio ImagingSystem, Syngene, Velika Britanija).

3.2.5 Kloniranje

Pomnožke PCR smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo in izbrane proge ustrezne dolžine izrezali iz gela, ter jih s kompletom (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) očistili iz gela po navodilih proizvajalca. Za kloniranje očiščenih pomnožkov smo uporabili komplet InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Hannover, Nemčija). 30 μ l ligacijske mešanice je vsebovalo 30 μ l plazmida ptZ57R/T, 1,5 μ l očiščenega PCR pomnožka, 3 μ l 10-kratnega ligacijskega pufra, 3 μ l PEG 4000 (polietilen glikol z molsko maso 4000), 1 μ l T4 DNK ligaze, 0,75 μ l albumina iz govejega seruma (BSA) in 17,75 μ l vode. Kompetentne celice *E. coli* smo po navodilih proizvajalca kita (v tem kitu so tudi reagenti za pripravo kompetentnih celic) najprej naredili kompetentne, potem pa transformirali z ligacijsko mešanico pri pogojih, ki so v navodilih kompleta InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit. Transformirane celice smo razmazali na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom (1000 μ g/ml), na katera smo enakomerno nanесли 40 μ l substrata X-gal (koncentracije 20 mg/ml v dimetilformamidu) in 4 μ l vodne raztopine izopropil tio- β -D-galaktozida (IPTG) (koncentracije 200 μ g/ml), ki je induktor gena *lacZ* zapisanega na plazmidu. Selektivno gojišče z ampicilinom omogoča rast le uspešno transformiranim celicam, ki so pridobile na plazmidu zapisano rezistenco na omenjeni antibiotik. β -galaktozidna aktivnost pa na podlagi belo-modre selekcije omogoča ločevanje med rekombinantnimi celicami, ki so vsebovale prazne plazmide in tistimi, ki so vsebovale plazmide z vgrajenimi pomnožki.

3.2.6 Izolacija plazmidne DNK

Kolonije transformiranih celic *E. coli* izbrane na podlagi modro-bele selekcije smo prenesli v 5 ml tekočega LB-Amp gojišča in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri 37°C in frekvenci 220 stresljajev/min. Iz 5 ml tekoče kulture smo 700 µl shranili pri -70°C, pri čemer smo kulturi dodali še 300 µl 50-odstotnega glicerola, 4 ml pa smo porabili za izolacijo plazmidov s kompletom High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Nemčija), ki temelji na alkalni lizi. Tako izolirano plazmidno DNK smo nato 100 x redčili in jo uporabili kot matrico v PCR.

3.2.7 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE; angl. *denaturing gradient gel electrophoresis*)

Za elektroforetsko ločitev pomnožkov PCR produktov smo uporabili D GENE™ sistem (Bio-Rad, ZDA). Za nanašanje vzorcev smo uporabili 2 x nanašalni pufer z glicerolom (0,05 % bromfenol modro, 0,05 % ksilen cianol, 70 % glicerol, voda). Elektroforeza je tekla v 9-odstotnem poliakrilamidnem gelu (akrilamid/bis-akrilamid 19:1) z 1 x TAE pufrom pri 60°C in 60 V 16 ur. Gel smo barvali s SYBR gold (Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, Molecular Probes (kat.št S-11494)). Po končani elektroforezi smo gele barvali 35 minut v 1 x raztopini barvila SYBR Gold (10.000 - kratno založno raztopino barvila smo redčili z elektroforetskim pufrom, t.j. 1 x TAE), na kratko sprali v destilirani vodi in potem pogledali ter slikali s sistemom SynGene (Chemi Genious2 – Bio ImagingSystem, SYNGENE). V transluminatorju smo izbrali SYBR Gold fotografski filter, nastavili ostrino, kontrast, odprtost zaslonke, čas osvetlitve ter gel slikali. Sliko smo še pretvorili iz sgd v jpg format, da smo jo lahko na računalniku obdelali.

3.2.8 Priprava začetnih oligonukleotidov

Nekateri začetni oligonukleotidi uporabljeni v PCR reakcijah so bili povzeti po literaturi, nekateri pa modificirani *in silico*. Po naših navodilih so jih sintetizirali v podjetju MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Nemčija) (<http://www.mwg-biotech.com/>).

3.2.9 Sekvenciranje in analiza sekvenc

Izbrane klone so sekvencirali po naročilu v podjetju Microsynth AG (Baglach, Švica) (<http://www.microsynth.ch>). Sekvenčne reakcije so potekale z začetnima oligonukleotidoma M13 uni(-21) in M13 rev(-29). S programoma 'Sequence match' in BlastN v bazah podatkov Ribosomal Database Project (RDP) ([Ribosomal Database..., 2006](#)) in GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) smo sekvencam izbranih PCR pomnožkov poiskali najbolj podobne sekvence. Sekvence smo med seboj primerjali s programom ClustalX (Multiple Sequence Alignment Program, version 1.83, Feb 2003) (Thomson in sod., 1997), genetske razdalje med poravnanimi sekvencami pa smo izračunali s programom DNAdist iz filogenetskega programskega paketa PHYLIP (Phylogeny Inference Package, Version 3.6) (Felsenstein, 2002).

4 REZULTATI

4.1 IZBIRA PRIMERNE METODE ZA IZOLACIJO DNK

4.1.1 Količina izolirane DNK

Za izolacijo skupne mikrobne DNK iz preučevanih vzorcev smo najprej preverili štiri metode (ultrazvok v kombinaciji s CTAB, kroglični stresalnik v kombinaciji s CTAB, proteinaza K v kombinaciji s SDS in CTAB, ter ultrazvok v kombinaciji s proteinazo K, SDS in CTAB) ki smo jih preizkusili na vzorcih dela črevesa z blatom črnega laboda ter delu slepega črevesa kunca. Osnova za ugotavljanje učinkovitosti metod je bilo merjenje absorbance DNK v vzorcih pri 260 nm, iz katerih smo, po formuli $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ ds DNK izračunali koncentracijo DNK v posamezni vzorcih. Slednjo smo nato delili z maso vzorca ter tako dobili izplen DNK za posamezno metodo, ki smo ga uporabili kot merilo učinkovitost primerjanih metod. Rezultati so prikazani v preglednici 4.1.

Preglednica 4.1: Primerjava učinkovitosti izolacije DNK štirih uporabljenih metod iz vzorcev črevesa laboda in kunca.

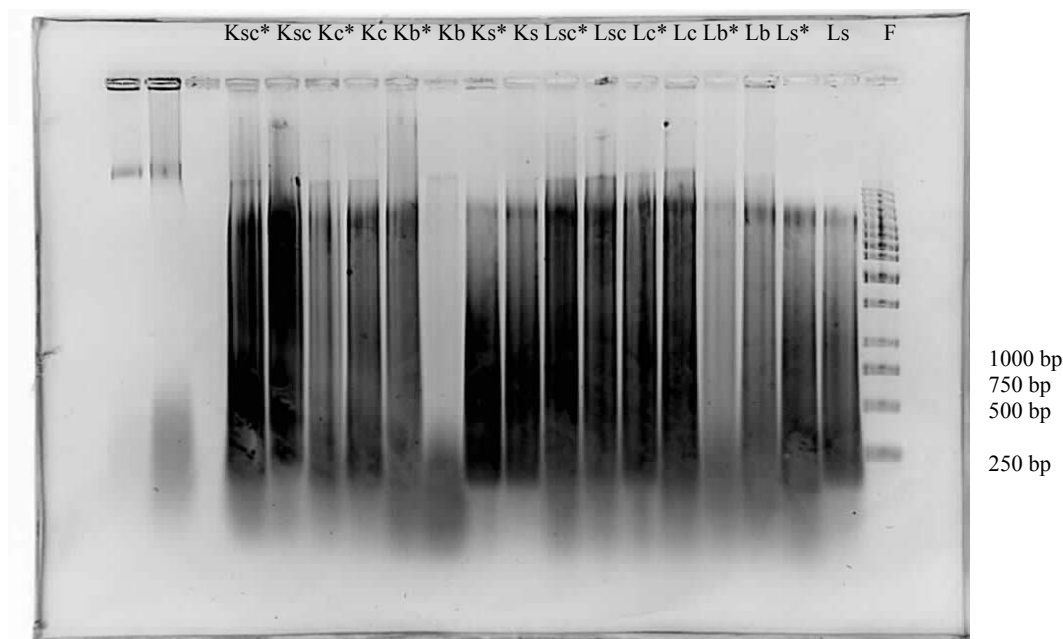
Vzorec (redčitev)	Koncentracija DNK [$\mu\text{g/ml}$]	Izplen DNK [$\mu\text{g/g}$]
Ls (50 x)	615,0	1635,64
Ls* (50 x)	875,0	2327,13
Lb (50 x)	865,0	3827,43
Lb* (50 x)	360,0	1592,92
Lc (250 x)	7300,0	26642,33
Lc* (250 x)	4637,5	16925,19
Lsc (500 x)	6575,0	25683,60
Lsc* (500 x)	6650,0	25976,56
Ks (50 x)	1327,5	4934,94
Ks* (50 x)	1400,0	5204,46
Kb (250 x)	2275,0	4809,73
Kb* (250 x)	3575,0	7558,14
Kc (1000 x)	12000,0	37151,70
Kc* (1000 x)	6600,0	20433,34
Ksc (500 x)	12350,0	32500,00
Ksc* (500 x)	15400,0	40526,32

L = črni labod, K = kunec, s = metoda z ultrazvokom in CTAB, b = metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, c = metoda s proteinazo K, SDS in CTAB, sc = Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB, * = paralelka

Kot najmanj učinkovita po kriteriju količine izolirane DNK se je izkazala metoda s krogličnim stresalnikom. Tej je sledila metoda ultrazvočnega razbijanja celic v kombinaciji s CTAB. Kot najučinkovitejši pa sta se izkazali metodi izolacije DNK s proteinazo K v kombinaciji s SDS in CTAB ter ultrazvoka v kombinaciji s proteinazo K, SDS in CTAB.

Pri nekaterih vzorcih lahko med paralelkami opazimo veliko nihanje. Največja razlika v izplenu in koncentraciji DNK je opazna pri DNK izolirani iz slepega črevesa kunca po metodi s proteinazo K, SDS in CTAB, medtem ko je najmanjša razlika med paralelkama pri DNK izolirani iz slepega črevesa kunca po metodi z ultrazvokom in CTAB.

Da bi učinkovitost izplena preverili še z alternativno metodo in tako potrdili rezultate spektrofotometrične analize, smo ustrezno redčeno skupno DNK izolirano iz vzorcev črevesa laboda in kunca s štirimi različnimi metodami prikazali še z elektroforetsko ločivijo (slika 4.1).



Slika 4.1: Elektroforetska ločitev izolirane DNK iz vzorcev črevesa z blatom črnega laboda in slepega črevesa kunca s štirimi izolacijskimi metodami v 0,8 % agaroznem gelu. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas); L = črni labod, K = kunec, s = metoda z ultrazvokom in CTAB, b = metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, c = metoda s proteinazo K, SDS in CTAB, sc = Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB, * = paralelka
Količina nanešene DNK: Ls, Ls*, Lb, Lb*: 3 µl; Lc: 3 µl 10x redčene; Lc*: 4 µl 10x redčene; Lsc, Lsc*: 6 µl 20x redčene; Ks, Ks*: 1,5 µl; Kb: 1 µl; Kb*: 5 µl 10x redčene; Kc: 3 µl 20x redčene; Kc*: 3 µl 10x redčene; Ksc: 8 µl 50x redčene; Ksc*: 6,5 µl 50x redčene.

Kot najmanj učinkovita metoda se je glede na rezultate elektroforeze izkazala metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, kot najbolj učinkovita pa metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB.

4.1.2 Kvaliteta izolirane DNK

Kvaliteto izolirane DNK s štirimi zgoraj navedenimi metodami smo ugotavljali na podlagi razmerja med DNK in RNK v vzorcih, ki smo ga izračunali iz absorpcijskih lastnosti nukleinskih kislin v vzorcih pri 260 in 280 nm (Preglednica 4.2).

Preglednica 4.2: Primerjava razmerij med nukleinskimi kislinami v vzorcih, izoliranih iz črevesa laboda in kunca, s štirimi različnimi metodami.

Vzorec	Absorbanca pri 260 nm	Absorbanca pri 280 nm	Razmerje A_{260}/A_{280}
Ls	0,246	0,145	1,6933
Ls*	0,350	0,202	1,7331
Lb	0,346	0,189	1,8259
Lb*	0,144	0,087	1,6620
Lc	0,584	0,310	1,8839
Lc*	0,371	0,204	1,8176
Lsc	0,263	0,144	1,8247
Lsc*	0,266	0,147	1,8151
Ks	0,531	0,289	1,8353
Ks*	0,560	0,315	1,7751
Kb	0,182	0,099	1,8294
Kb*	0,286	0,157	1,8190
Kc	0,240	0,136	1,7594
Kc*	0,132	0,082	1,6053
Ksc	0,494	0,270	1,8277
Ksc*	0,616	0,334	1,8454

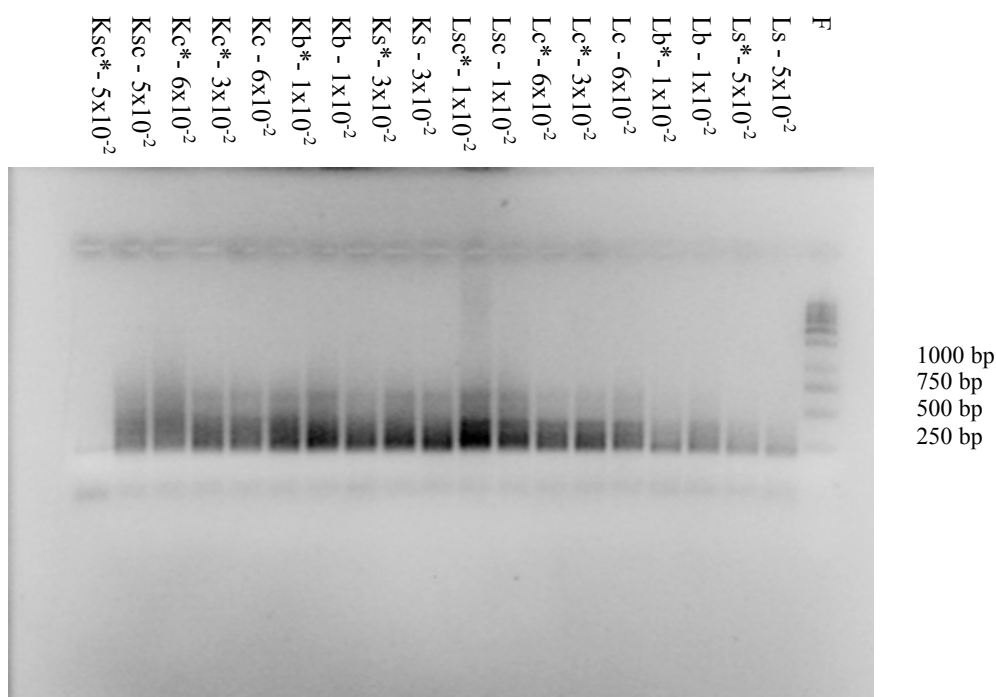
L = črni labod, K = kunec, s = metoda z ultrazvokom in CTAB, b = metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, c = metoda s proteinazo K, SDS in CTAB, sc = Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB, * = paralelka

Stopnja čistosti izolirane DNK (preglednica 4.2) je bila pri vseh preiskovanih vzorcih v ustreznem območju. Pri vzorcih Ls, Lb* in Kc* je bilo razmerje med DNK in RNK blizu spodnje meje čistosti DNK, ki je potrebna za oceno koncentracije DNK, medtem ko sta se idealnemu razmerju med DNK in RNK, ki je 2,0 pri nekontaminirani DNK, najbolj približala vzorca Lc in Ksc*.

4.1.3 Primernost izolirane DNK za molekularno biološke analize

Primernost izolirane DNK za molekularno biološke analize uporabljene v nalogi smo ugotavljali na podlagi učinkovitosti pomnoževanja dela bakterijskih genov za 16S rRNK iz zgoraj navedenih vzorcev, ter ločevanja tako dobljenih pomnožkov z DGGE.

Skupno DNK v vzorcih smo ustrezno redčili in jo uporabili kot matrico v PCR, v kateri smo z uporabo evolucijsko ohranjenih širokospecifičnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov Eub338gc in 534 uspešno pomnožili približno 200 nukleotidov dolge segmente bakterijskih genov za 16S rRNK (slika 4.2).



Slika 4.2: Elektroforetska ločitev PCR pomnožkov v 1 % agaroznem gelu.

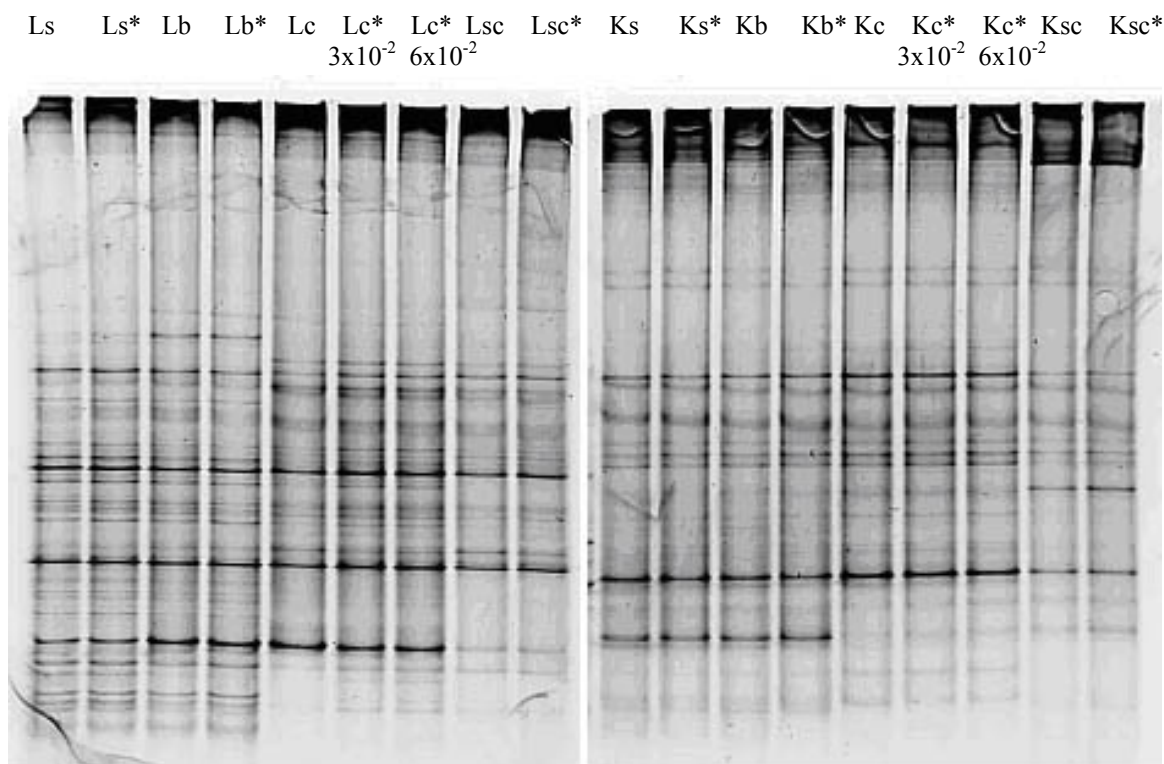
F = velikostni standard 1 kb (Fermentas); L = črni labod, K = kunec, s = metoda z ultrazvokom in CTAB, b = metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, c = metoda s proteinazo K, SDS in CTAB, sc = Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB, * = paralelka. Poleg oznake vzorca so navedene redčitve.

Po elektroforetski ločitvi PCR pomnožkov v 1 % agaroznem gelu (slika 4.2) so vse proge neostre. Temu je vzrok nespecifično podvojevanje med PCR, in sicer zaradi preveč matrične DNA, prenizke temperature, prevelikega števila ciklov, itd. Poseben problem pa so začetni oligonukleotidi z GC čeljustmi. Te se lahko med seboj zlepljajo, zato nastajajo

različno dolgi pomnožki, ki jih vidimo kot neostre proge. Tudi sama raztopina začetnega oligonukleotida z GC čeljustjo je lahko heterogena. Lahko je mešanica začetnih oligonukleotidov, ki imajo enako specifično sekvenco, vendar različno dolge GC čeljusti. Pri širokospecifičnih začetnih oligonukleotidih pa je normalno, da proge niso nujno ostre, ker se pomnoži različno število tarčnih sekvenc od zelo različnih mikrobov. Nekateri imajo na tem delu lahko delecije ali insercije, zato so pomnožki različno dolgi. Ko uporabljamo širokospecifične začetne oligonukleotide, temperatura prileganja ne sme biti previsoka, sicer se začetni oligonukleotidi nekaterih mikrobnih skupin nebi pomnožili. Širokospecifičnost temelji namreč tudi na tem, da s tem začetnim oligonukleotidom lahko uspešno pomnožimo tudi tarčno zaporedje mikrobne skupine, ki se ne ujema povsem s sekvenco začetnega oligonukleotida.

Pomnožke PCR smo ločili z DGGE v 9 % poliakrilamidnem gelu (slika 4.3). Na podlagi učinkovitosti ločevanja pomnožkov iz obeh vzorcev smo ocenili primernost uporabljenih metod za izolacijo DNK za nadaljnje postopke uporabljene v nalogi.

Število prog na DGGE gelu je odvisno od metode izolacije DNK. Če je število zelo majhno, metoda izolacije najbrž ni primerna. Če pa je po drugi strani število prog zelo veliko, pa lahko to pomeni tudi preveliko število artefaktov PCR, ki so najbrž nastali zaradi preveč poškodovane DNK. Na DGGE smo dali enake vzorce, iz katerih smo po različnih metodah izolirali DNK, da bi preverili vpliv izolacije DNK na pojavljanje prog v DGGE profilu. Število prog naj bi odražalo divezitetu ekosistema.



Slika 4.3: DGGE elektroforetska ločitev Eub338gc/534 pomnožkov PCR iz izbranih vzorcev.

F = velikostni standard 1 kb (Fermentas); L = črni labod, K = kunec, s = metoda z ultrazvokom in CTAB, b = metoda s krogličnim stresalcem in CTAB, c = metoda s proteinazo K, SDS in CTAB, sc = Metoda s proteinazo K, SDS, ultrazvokom in CTAB, * = paralelka. Poleg oznake vzorca so navedene redčitve.

Največje število prog in s tem tudi občutljivost DGGE analize je vidna pri metodi z ultrazvokom in CTAB (Ls, Ks) ter metodi s krogličnim stresalcem in CTAB (Lb, Kb). Število prog obeh metod je primerljivo in večje tako od metode s proteinazo K, SDS-om v kombinaciji s CTAB (Lc, Kc) kot tudi od metode izolacije z ultrazvokom v kombinaciji s proteinazo K, SDS in CTAB (slika 4.3.).

4.2 PRIPRAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Uporabili smo 6 začetnih oligonukleotidov za klamidije:

1. **CHL_16S(20)f** (5' GCGTGGATGARGCATGCAA 3') je modificirani začetni oligonukleotid 16SF, katerega sekvenca (5' - GCGTGGATGAGGCATGCAA - 3') je objavljena na spletni strani (The comprehensive..., 2002). Prilega na začetku gena za 16S

rRNK in je proti 3' koncu obrnjen (angl. *forward*) začetni oligonukleotid. Oligonukleotid smo modificirali tako, da smo na mestu 11. nukleotida s 5' konca vgradili oba purina (adenin oz. gvanin) v ekvimolarnem razmerju. Polovica sintetiziranih oligonukleotidov je tako na tem mestu imela vgrajen gvanin, druga polovica pa adenin. Kodni znak za to kombinacijo nukleotidov je R (puRine). V preglednici 4.3 so prikazani rezultati ugotavljanja specifičnosti začetnih oligonukleotidov v bazi podatkov RDP II z orodjem Probe match (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>).

Z modifikacijo sekvence začetnega oligonukleotida 16SF nismo bistveno izboljšali specifičnosti le-tega. Razlog za modifikacijo je bila razlika v delu sekvence 16S rRNA *Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis* (RKP_sHep; AY223862), ki predstavlja mesto za naleganje začetnega oligonukleotida 16SF (5 - GCGTGGATGAAGCATGCAA - 3') (Kostanjšek in sod., 2004). Iskanje sekvenc, ki vsebujejo komplementarno sekvenco z orodjem Probe Match je pokazalo, da ima približno 87% vseh klamidijjskih sekvenc vključenih v iskanje komplementarno sekvenco z CHL_16S(20)f. Ta odstotek se ne spremeni bistveno, če pri iskanju dovolimo eno ali dve napačni ujemanji. 10 sekvenc, ki niso klamidijjskega izvora, vsebuje popolnoma enako sekvenco kot CHL_16S(20)f, kar omogoča napake pri odkrivanju, ta odstotek pa se močno dvigne, če pri iskanju dopustimo kakšno napačno ujemanje posameznih nukleotidnih parov.

2. **CHL_16S (1300)r** (5' – CCATGATGTGACGGGCGG – 3') je reverzni komplement široko specifičnega začetnega oligonukleotida 16SF2, katerega sekvenco (5' – CCATGATGTGACGGGCGG – 3') so objavili Everett in sod. (1999) in prilega okoli mesta 1300 v genu za 16S rRNK (po *E. coli* štetju). V originalnem opisu so ga uporabljali kot proti 3' koncu (angl. *forward*) začetni oligonukleotid, mi pa smo ga uporabili kot proti 5' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid (angl. *reverse*). Oligonukleotid ni najbolj specifičen in omogoča prepoznavo približno 80 % vseh klamidijjskih sekvenc vključenih v iskanje, istočasno pa omogoča prepoznavo velikega števila drugih sekvenc organizmov, ki ne sodijo v klamidijjsko deblo.

3. **CHL_16S(270)f** (5'- GACGTCTAGGCGGRYTGAGAG - 3') smo naredili iz proti 5' koncu obrnjenega začetnega oligonukleotida (angl. *reverse*) (5'

CTCTCAGCCCGCCTAGACGTCTTAG 3'), ki sta ga objavila Ossewaarde and Meijer (1999) in prilega okoli mesta 270 v genu za 16SrRNK. Ta začetni oligonukleotid ni najbolj specifičen, zato smo vnesli dve spremenjeni mesti, naredili njegov reverzni komplement in ga poimenovali CHL_16S(270)f. Modificirani oligonukleotid CHL_16S(270)f omogoča preopznavo 97,7 % vseh klamidijjskih sekvenc vključenih v iskanje in je zelo specifičen, saj šele pri dveh dopuščenih napakah prepozna tudi 25 sekvenc organizmov, ki ne sodijo v klamidijjsko deblo.

4. **CHL_16S(530)r** (5'- GWATTACCGCRGCKGCTG -3') je začetni široko specifični oligonukleotid, ki smo ga naredili na osnovi sonde Universal2 (5'- GWATTACCGCGGCKGCTG -3'), ki so jo pripravili Liu in sodelavci (Liu in sod., 2001). Nalega na mestih 522 – 539. Omenjeni oligonukleotid kljub univerzalnosti ne omogoča prepoznave klamidijjskih sekvenc, zato smo vnesli degenerirana mesta. Z eno dovoljeno napako ta degenerirani začetni oligonukleotid omogoči prepoznavo skoraj vseh klamidijjskih sekvenc. Seveda omogoča tudi prepoznavo velikega števila drugih sekvenc, ki prihajajo iz organizmov, ki ne sodijo v klamidijjsko filogenetsko deblo.

5. **CHL_16S(270)f_dgge** je začetni oligonukleotid za DGGE narejen na osnovi zgoraj opisanega začetnega oligonukleotida CHL_16S(270)f. Le temu smo prilepili GC čeljust, sestavljeno iz 40 zaporednih gvaninov oz citozinov, ki smo jo pripravili po posvetu z dr. Janom Kopecnym (Češka akademija znanosti, Inštitut za živalsko fiziologijo in genetiko, Praga). Tako smo dobili proti 3' koncu (angl. *forward*) klamidijjski začetni oligonukleotid za DGGE.

6. **CHL_16S(530)r_dgge** je prav tako začetni oligonukleotid za DGGE. Le tega smo pripravili na osnovi zgoraj opisanega oligonukleotida CHL_16S(530)r (5'- GWATTACCGCRGCKGCTG -3'), ki je proti 5' koncu obrnjeni začetni oligonukleotid (angl. *reverse*). Uporabili smo reverzni komplement GC čeljusti, ki smo jih uporabili pri začetnem oligonukleotidu CHL_16S(270)f_dgge.

Preglednica 4.3: Specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

	% / Št. zadetkov brez napak (0)	Št. zadetkov izven debla <i>Chlamydia</i> (0)	% / Št. zadetkov z 1 napako (1)	Št. zadetkov izven debla <i>Chlamydia</i> (1)	% / Št. zadetkov z 2 napakama (2)	Št. zadetkov izven debla <i>Chlamydia</i> (2)	% / Št. zadetkov s 3 napakami (3)	Št. zadetkov izven debla <i>Chlamydia</i> (3)
CHL_16S(20)f	87,0 / 154	10	88,1 / 156	437	88,1 / 156	896	nd	nd
CHL_16S(1300)r	81,3 / 144	304	84,1 / 149	34.343	84,7 / 150	44.435	nd	nd
CHL_16S(270)f	97,7 / 173	0	100 / 177	0	100 / 177	25	100 / 177	714
CHL_16S(530)r	98,3 / 174	88.900	100 / 177	98.023	100 / 177	98.653	nd	nd

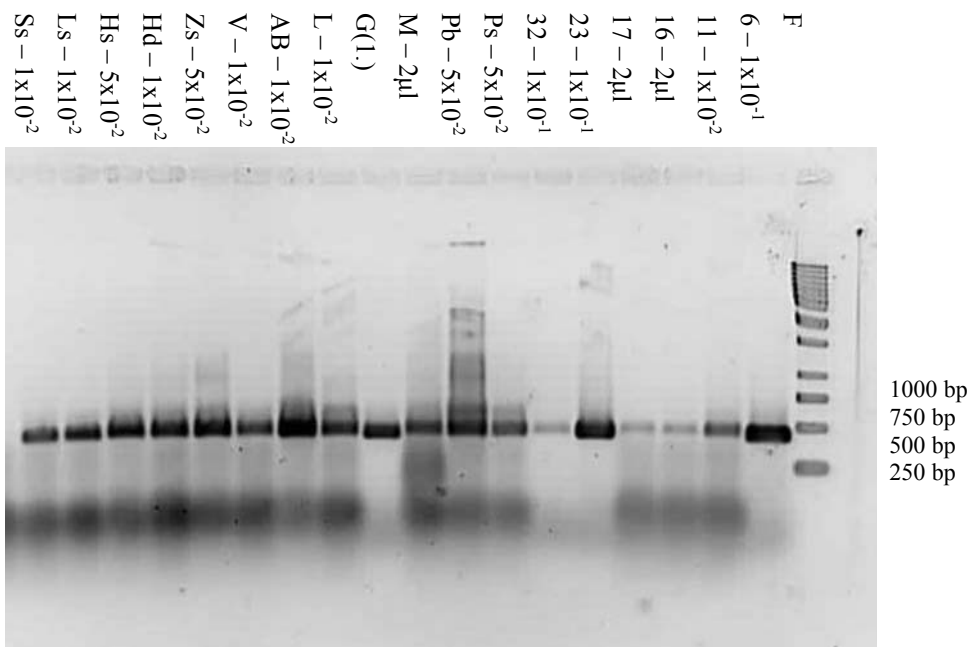
Podatki veljajo na dan 10.10.2006, ko je baza obsegala 99183 sekvenc. Preverjanje specifičnosti smo izvedli na okrnjeni bazi podatkov, ki je vsebovala le sekvence dobre kvalitete, daljše od 1200 bp, ki pa so izvirale tako iz gojenih tipskih in netipskih organizmov, kot iz okoljskih klonov. Na dan preverjanja specifičnosti je opisanim kriterijem zadostilo 177 sekvenc v bazi RDP2, ki so bile uvrščene v deblo *Chlamydia*.

Oligonukleotidov CHL_16S(20)f in CHL_16S(1300)r v PCR nismo uporabili. Analizirali pa smo jih *in silico*. Po *in silico* analizi smo delo nadaljevali z oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r, ker sta z orodjem Probe match dala boljše rezultate.

4.3 NAMNOŽEVANJE BAKTERIJSKIH 16S RIBOSOMSKIH GENOV V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO DNK (PCR)

V prvem koraku smo ugotavljali, ali lahko iz DNK izolirane iz vseh opisanih vzorcev (preglednici 3.1 in 3.2) namnožimo del gena za 16S rRNK z začetnima oligonukleotidoma F968 in R1401. To sta evolucijsko ohranjena začetna oligonukleotida, ki omogočata namnoževanje tega dela gena za 16S rRNK pri veliki večini bakterij in sta v našem primeru služila kot kontrola reakcije PCR in prisotnost bakterijske rDNK v vzorcu.

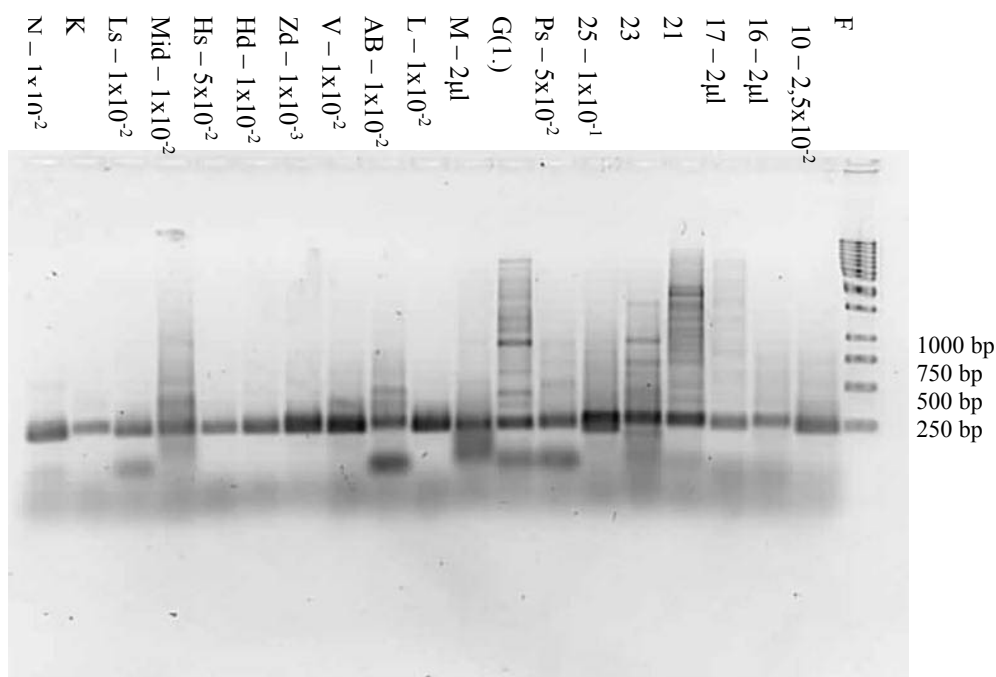
Z omenjenima začetnima oligonukleotidoma smo uspešno namnožili PCR pomnožek z ustrežno velikostjo DNK iz vseh vzorcev. Verižne reakcije po pričakovanju niso delovale enako učinkovito pri vseh vzorcih. Zato smo skupno mikrobnno DNK, ki je služila kot matrica v reakcijah, v nekaterih primerih redčili. Redčitve posameznih vzorcev so bile od 10 – kratne do 500 – kratne in so zapisane ob oznakah vzorcev (slika 4.4).



Slika 4.4: Elektroforetsko ločeni pomnožki PCR, namnoženi z začetnima oligonukleotidoma F968/R1401. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas), ostale oznake v preglednicah 3.1 in 3.2.

4.3.1 Namnoževanje klamidijskih 16S ribosomskih genov v verižni reakciji s polimerazo DNK (PCR)

V naslednjem koraku smo ugotavljali, ali lahko z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r v preučevanih vzorcih uspešno pomnožimo dele klamidijskih genov 16S rRNK in s tem potrdimo njihovo prisotnost v vzorcih.



Slika 4.5: Elektroforetsko ločeni pomnožki PCR, namnoženi z začetnima klamidijskima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f/CHL_16S(530)r. V reakcijo PCR smo dali najprimernejšo količino DNK. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas), ostale oznake v preglednicah 3.1 in 3.2.

Pomnožke ustrezne velikosti (260 bp) smo uspešno namnožili pri 35 od skupno 46 vzorcev (preglednica 4.4). Glede na slike gelov barvanih z etidijevim bromidom smo izbrali PCR pomnožke s tako redčitvijo DNK, da bi bile proge na sliki pri vseh vzorcih enako vidne. Ker pa smo potem gel barvali s SYBR gold, ki je občutljivejše barvilo, so na gelu vidne tudi proge, ki vsebujejo precej manjšo količino DNK. Poleg pomnožkov pričakovane velikosti so tako pri številnih vzorcih opazni tudi pomnožki neprave velikosti. Opazi se tudi lise, ki so najverjetneje ostanki začetnih oligonukleotidov ali med seboj sparjenih začetnih oligonukleotidov (t.i. primer-dimer struktur), ki kažejo na optimalno reakcijsko mešanico sestavnih delov reakcije PCR.

Preglednica 4.4: Vzorci, pri katerih smo s kombinacijo začetnikov, značilnih za skupino klamidij, uspešno pomnožili dele klamidijevih genov 16S rRNK.

oznaka	žival	Pričakovani PCR pomnožek	Dodatni neznačilni PCR pomnožki
5	pajek	+	-
6	pajek	+	-
10	ravnokrilci	+	-
14	enakonožec	+	+
16	enakonožec	+	-
17	enakonožec	+	-
18	enakonožec	+	-
21	stonoga	+	+
23	stonoga	+	+
25	postranica	+	-
26	postranica	+	-
27	postranica	+	-
31	enakonožec	+	-
33	enakonožec	+	-

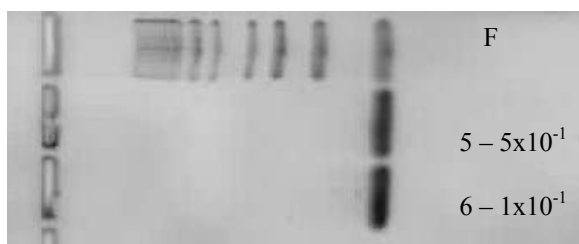
Ss	skobčevkla	+	-
Sd	skobčevkla	+	-
K	kljunorožec	+	-
G(1.)	navadni gož	+	+
Ps	kraljevi piton	+	-
Pb	kraljevi piton	+	-
Hs	ruski hrček	+	-
Hd	ruski hrček	+	-
V	navadna veverica	+	-
M	modras	+	-
Mis	miš	+	-
Mid	miš	+	+
N	noj	+	-
Zs	divji zajec	+	+
Zd	divji zajec	+	-
L	zeleni legvan	+	-
G(2.)	navadni gož	+	-
Ls	črni labod	+	-
Ks	kunec	+	-

AB	aktivno blato	+	+
AB+TE	aktivno blato	+	+

4.4 KLONIRANJE KLAMIDIJSKIH POMNOŽKOV

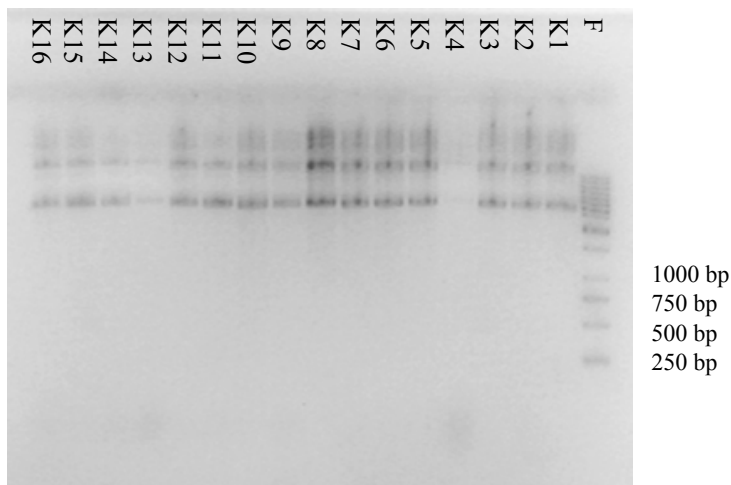
Da bi potrdili pravo identiteto PCR pomnožkov, ki smo jih namnožili z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r, smo dva izbrana pomnožka, pri katerih ob pomnoževanju nismo opazili pomnožkov neprave velikosti, ločili z molekulskim kloniranjem.

Po elektroforetski ločitvi v 1 % agaroznem gelu (slika 4.6) smo oba pomnožka izrezali iz gela ter ju prečistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit, ter s kompletom InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit klonirali v *E. coli* sev TOP10 po navodilih proizvajalca.



Slika 4.6: Elektroforetsko ločeni eluirani pomnoženi deli ribosomskih genov vzorca 5, ki je 50 x redčen in vzorca 6, ki je 10 x redčen z začetnima klamidijama oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas), ostali oznaki v preglednici 3.1.

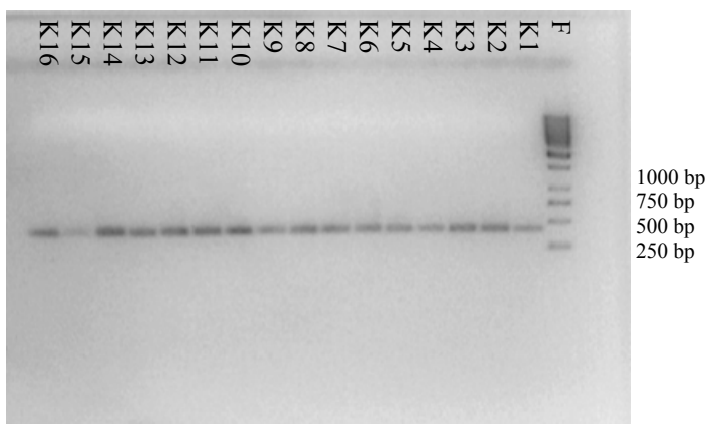
Iz 16 (po osem iz vsakega pomnožka) naključno izbranih klonov transformiranih *E. coli* smo s kompletom High Pure Plasmid Isolation Kit izolirali plazmidno DNK in jo ločili na 1 % agaroznem gelu (slika 4.7).



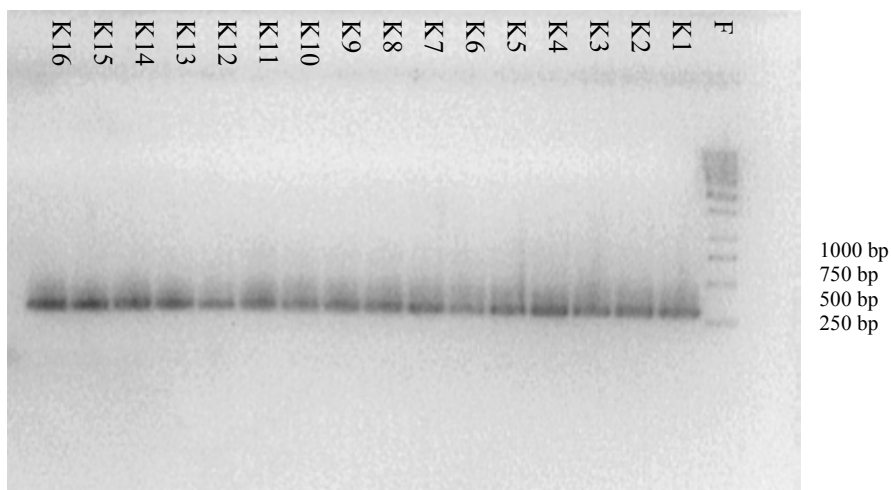
Slika 4.7: Plazmidna DNK 16 naključno izbranih klonov. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas).

4.4.1 Analiza klonov z DGGE

Plazmidno DNK 16 klonov (kloni ena do osem pripadajo pomnožku pet, kloni devet do šestnajst pa pomnožku šest) smo primerno redčili in jo uporabili kot matrico v PCR z začetnima oligonukleotidoma M13uni(-21) in M13rev(-29). To sta univerzalna sekvencijska začetna oligonukleotida, ki se uporabljata pri sekvenciranju insertov vnesenih v vse tiste plazmide, ki imajo kot osnovo za poliklonsko mesto vgrajeno sekvenco faga M13. Na ta način lahko pridobimo celotno sekvenco inserta, ki je z začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju, ne bi mogli. Tako dobljene pomnožke (slika 4.8) smo ponovno ločili v 1% agaroznem gelu, jih očistili kot v prejšnjem primeru, ter jih uporabili kot matrico v DGGE-PCR z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r (slika 4.9). Pomnožke smo ločili z DGGE analizo v 9 % poliakrilamidnem gelu in 35-60 % denaturacijskem gradientu, 19:1, 1 x TAE, 60°C, 60V, 16h (slika 4.10).

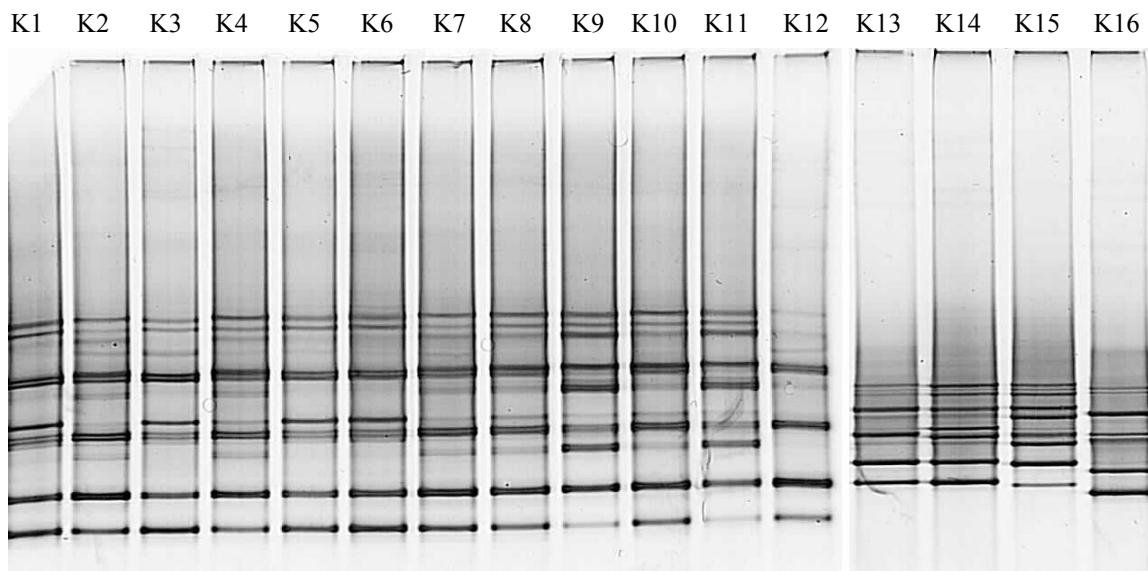


Slika 4.8: PCR pomnožki plazmidne DNK izbranih klonov. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas).



Slika 4.9: Pomnožki šestnajstih klonov klamidijevih genov za 16S rRNA pomnoženi z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r. F = velikostni standard 1 kb (Fermentas).

Slika 4.10 prikazuje DGGE elektroforetsko ločitev kloniranih pomnožkov klamidijskih ribosomskih genov, ki smo jih namnožili z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r.



Slika 4.10: DGGE analiza šestnajstih klonov klamidijskih genov za 16S rRNA.

Opomba: Slika je sestavljena iz dveh gelov (K1 - K12 in K13 - K16). Ker je izredno težko zagotoviti identične razmere v katerih poteka gradientna gelska elektroforeza, so pomnožki potovali v obeh gelih različno hitro in različno dolgo časa, zato sliki nista neposredno primerljivi.

DGGE analiza je pokazala veliko heterogenost kloniranih pomnožkov v obliki različnih DGGE profilov posameznih klonov. Pojavilo se je različno število pasov, ki pa so tudi različno močno vidni. Spodnja dva pasova sta pri vseh vzorcih približno enaka, do odstopanj pa pride pri ostalih pasovih. Poleg spodnjih dveh pasov je pri vzorcu K16 še pet dobro vidnih pasov, pri vzorcih K1, K5, K6, K11, K12, K13, K14, K15 še sedem, pri vzorcih K2, K3 osem, pri vzorcih K4, K10 devet in pri vzorcih K7, K8, K9 še deset. Glede na to, da so to kloni, smo pričakovali le en pas pri vsakem vzorcu, dobili pa smo jih veliko več. Vzrok multiplosti je verjetno v tem, da smo uporabili degenerirane začetne oligonukleotide, zaradi česar je možnih več različnih kombinacij pomnožkov. Uporabljeni sistem pa očitno omogoča ločevanje tudi med inserti, ki se ločijo v zelo majhnem številu nukleotidov v sekvenci.

4.5 SEKVENCIRANJE IN ANALIZA SEKVENC

4.5.1 Sekvenciranje genov za 16S rRNK izbranih klonov in analiza sekvenčnih podatkov

Na podlagi analize klonov z DGGE smo naključno izbrali šest klonov (po tri za vsak DGGE pomnožek, in sicer za pomnožek pet klone K1, K2 in K8 ter za pomnožek šest klone K9, K10 in K16) in sekvencirali njihove inserte z deli genov za 16S rRNK. V petih primerih so bili kromatogrami čitljivi in kvalitetni, en kromatogram pa je bil neuporaben, zato ena sekvenca manjka.

V pridobljenih sekvencah smo najprej poiskali sekvence začetnih oligonukleotidov CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r. 5' in 3' viseče konce smo odrezali, saj je to sekvenca plazmida, ki nas za primerjavo klamidijevih insertov ne zanima.

>K1

GACGTCTAGGCGGATTGAGAGATTGACCGCCAACATTGGGACTGAGACACTGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAACCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAAC
TGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCCGCCGCGGTAA
TAC

>K2

GACGTCTAGGCGGGCTGAGAGATTGACCGCCAACATTGGGACTGAGACACTGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAACCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAAC
TGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TAC

>K8

GACGTCTAGGCGGGTTGAGAGATTGACCGCCAACATTGGGACTGAGACACTGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAACCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAAC
TGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TTC

>K10

GACGTCTAGGCGGGCTGAGAGATTGACCGCCAACATTGGGACTGAGACACTGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAACCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAAC
TGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT

>K16

GACGTCTAGGCGGATTGAGAGATTGNCCGCCAACATTGGGNCTGAGACNCTGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTGTAAACTCTCCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACT
GATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAATCTCCGTGCCAGCCG

Slika 4.11: Sekvence začetnih delov genov za 16S rRNK izbranih klonov v FASTA obliki. Podčrtane so regije naleganja začetnih oligonukleotidov (CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r).

Dolžina vseh sekvenc je 217 nukleotidov (brez začetnih oligonukleotidov), delež GC pa se giblje med 50,7 in 51,2 odstotki.

Tako dobljenim sekvencam smo z algoritmom BlastN (National center... , 1993) poiskali najbolj podobne sekvence v bazah podatkov.

Primerjava dobljenih sekvenc s sekvencami v podatkovnih zbirkah je pokazala, da so vse sekvence najbolj podobne klamidijским sekvencam (preglednica 4.5). Vse sekvence so najbolj podobne sekvenci gena za 16S rRNA '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', podobnost pa se giblje med 92 in 96 odstotki.

Preglednica 4.5: Seznam najpodobnejših sekvenc v bankah podatkov.

klon	Najbližji zadetki v bazi podatkov	Odstotek podobnosti	Dolžina primerjanih sekvenc
K1	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	97	256
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	96	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	96	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWC22</i> (AF083616)	95	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae LKK-1</i> (AY555075)	93	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone cvE6</i> (AF448722)	93	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae TW-183</i> (AE017160)	93	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWE1</i> (AF083614)	94	162
	<i>Neochlamydia hartmannellae</i> (AF177275)	94	162
	<i>Chlamydia pecorum</i> (CPU73785)	93	162
K2	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	256
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	95	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	95	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWC22</i> (AF083616)	94	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae LKK-1</i> (AY555075)	92	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone cvE6</i> (AF448722)	92	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae TW-183</i> (AE017160)	92	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWE1</i> (AF083614)	93	162
	<i>Neochlamydia hartmannellae</i> (AF177275)	93	162
	<i>Chlamydia pecorum</i> (CPU73785)	92	162
K8	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	97	254
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	95	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	95	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWC22</i> (AF083616)	95	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae LKK-1</i> (AY555075)	93	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone cvE6</i> (AF448722)	93	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae TW-183</i> (AE017160)	93	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWE1</i> (AF083614)	93	162
	<i>Neochlamydia hartmannellae</i> (AF177275)	93	162
	<i>Chlamydia pecorum</i> (CPU73785)	93	162
K10	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	251
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	95	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	95	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWC22</i> (AF083616)	94	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae LKK-1</i> (AY555075)	92	162
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone cvE6</i> (AF448722)	92	162
	<i>Chlamydophila pneumoniae TW-183</i> (AE017160)	92	162
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWE1</i> (AF083614)	93	162
	<i>Neochlamydia hartmannellae</i> (AF177275)	93	162
	<i>Chlamydia pecorum</i> (CPU73785)	92	162
K16	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	95	243
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	94	152
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	94	152
	<i>Chlamydophila pneumoniae LKK-1</i> (AY555075)	92	152
	<i>Chlamydophila pneumoniae TW-183</i> (AE017160)	92	152
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp. UWC2</i> (AF083616)	93	152
	<i>Chlamydia pecorum</i> (CPU73785)	92	152
	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (CPU73783)	92	152
	<i>Chlamydia trachomatis A/HAR-13</i> (CP000051)	92	152
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-6</i> (AF364568)	92	152

Ker smo želeli tudi ugotoviti, koliko in kako so si sekvence podobne med seboj smo jih s programom ClustalX najprej poravnali in nato s programom DNAdist iz filogenetskega programskega paketa PHYLIP izračunali še genetske razdalje med njimi.

Nucleic acid sequence Distance Matrix program, version 3.573c
 5 species, 257 sites
 Kimura 2-parameter Distance
 Base Frequencies:

A C G T(U)
 0.25000 0.25000 0.25000 0.25000
 Transition/transversion ratio = 2.000000
 (Transition/transversion parameter = 1.500000)

Name	Sequences					
----	-----					
K1	GACGTCTAGG	CGGATTGAGA	GATTGACCGC	CAACATTGGG	ACTGAGACAC	TGCCCAAAC
K2GC.....
K8G.....
K10GC.....
K16N....	N.....N.
K1	CCTACGGGAG	GCTGCAGTCG	AGAATCTTTC	GCAATGGGCG	AAAGCCTGAC	GAAGCGACGC
K2
K8
K10
K16
K1	TGCGTGAGTG	ATGAAGGCTT	TCGGGTTGTA	AAACTCTTTC	GCGCAAGAGC	AAAGTGTATT
K2
K8
K10
K16-.....C.
K1	AGTGAATAAC	TGATGCATAT	GAGAGTACTG	CGTAAAGAAG	CACCGGCTAA	-CTCCGTGCC
K2
K8
K10
K16	T.....
K1	AGCCGCCGCG	GTAATAC				
K2	...A.....				
K8	...A.....T.				
K10	...A.....	..-----				
K16	-----				

5

K1				
K2	0.0118			
K8	0.0119	0.0079		
K10	0.0121	0.0000	0.0040	
K16	0.0042	0.0169	0.0126	0.0169

Slika 4.12: Poravnava sekvenc in izračun genetskih razdalj med njimi

Na zgornji sliki lahko vidimo, da so razlike med sekvencami minimalne in to odraža tudi trikotna matrika, iz katere lahko razberemo, da je največja izračunana genetska razdalja 0,0169 med sekvencama K1 in K10 ter K1 in K16. Vsekakor analiza sekvenc potrjuje, da prihajajo iz filogenetsko zelo sorodnih organizmov. Za podrobnejše ugotovitve bi morali pridobiti daljše sekvence.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 IZBIRA PRIMERNE METODE ZA IZOLACIJO DNK

V prvem delu diplomske naloge smo na manjšem številu izbranih vzorcev ugotavljali, katera metoda za izolacijo DNK je najprimernejša za nadaljnja preučevanja. Učinkovitost uporabljenih metod smo preverjali z ugotavljanjem koncentracije in čistosti izolirane mikrobne DNK. Molekula DNK izraža specifičen UV absorpcijski spekter z minimumom pri 230 nm in maksimumom pri 260 nm. Valovna dolžina maksimalne absorpcije in vrednost A_{\max} sta odvisni od bazne sestave DNK molekule in urejenosti DNK v dvojnoverižno strukturo. Iz vrednosti A_{260} smo izračunali koncentracijo DNK v vzorcih. Informacijo o čistosti izolirane DNK pa smo dobili z merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm, ter računanjem razmerja dobljenih absorbanc (A_{260}/A_{280}), ki ga uporabljamo kot kvalitativno merilo za čistost DNK. Pri vseh preiskovanih vzorcih je bila stopnja čistosti v ustreznem območju in zato to ni vplivalo na izbiro metode (preglednica 4.2).

Primernost metode smo izbirali tudi glede na količino in kvaliteto izolirane DNK iz črevesa kunca in laboda, ki smo ju izbrali zaradi razpoložljive količine vzorca. Med primerjanimi metodami sta po izplenu precej izstopali metodi izolacije DNK s proteinazo K v kombinaciji s SDS in CTAB in metoda ultrazvočnega razbijanja celic v kombinaciji s proteinazo K, SDS in CTAB (preglednica 4.1). Kljub učinkoviti izolaciji, pa je DGGE analiza pomnožkov DNK, izolirane z navedenima metodama, pokazala manjše število prog v primerjavi z ostalima uporabljenima metodama izolacije DNK in s tem tudi manjšo primernost navedenih dveh metod v nadaljevanju naloge (slika 4.1). Metodi izolacije z ultrazvokom v kombinaciji s CTAB ter izolacije s krogličnim stresalnikom v kombinaciji s CTAB sta se izkazali kot primernejši za odkrivanje pestrosti mikrobne združbe z DGGE analizo. V našem primeru naj bi ocena pestrosti analizirane združbe z DGGE analizo služila kot osnova za ugotavljanje učinkovitosti izolacije mikrobne DNK iz različnih mikroorganizmov po principu, da metoda, ki omogoča odkritje večjega števila ribotipov, omogoča tudi razbitje in izplen DNK iz večjega števila različnih celic. Tako smo se na podlagi opisanih rezultatov odločili, da bomo kljub slabšemu izplenu uporabili eno od metod, ki vključujejo fizikalno razbitje celic in teh metod ne bomo kombinirali s kemijsko

lizo s proteinazo K in SDS. Metodo, v kateri smo razbijali mikrobne celice z ultrazvokom smo izbrali zato, ker je izpljen pri metodi s krogličnim stresalnikom precej bolj nihal.

5.2 PRIPRAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

V sklopu diplomske naloge smo pripravili šest začetnih oligonukleotidov za odkrivanje klamidij. Eden od teh, CHL_16S(1300)r je bil le reverzni komplement začetnega oligonukleotida 16SF, ostale pa smo povzeli na osnovi že prej znanih začetnih oligonukleotidov ali sond in jih po analizi specifičnosti primerno modificirali. *In silico* opravljena analiza specifičnosti modificiranih začetnih oligonukleotidov je pokazala, da je začetni oligonukleotid CHL_16S(270)f daleč najbolj specifičen in zato smo ga v poskusih uporabljali kot proti 3' koncu obrnjen začetni oligonukleotid. Ker se je od obeh, proti 5' koncu obrnjenih, široko specifičnih začetnih oligonukleotidov, CHL_16S(530)r izkazal kot precej bolj primeren za pomnoževanje klamidijskih sekvenc kot CHL_16S(1300)r, smo se odločili za par oligonukleotidov, ki sicer omogoča pomnoževanje le dokaj kratkega dela klamidijskih ribosomskih genov, a to z veliko večjo verjetnostjo. Zaradi istega razloga smo izbrali omenjena začetna oligonukleotida tudi kot možna nosilca GC čeljusti, ki smo ju nato uporabili v verižnih reakcijah s polimerazo, ki so bile namenjene analizi z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo.

5.3 NAMNOŽEVANJE 16S RIBOSOMSKIH GENOV V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO DNK (PCR)

Z začetnima oligonukleotidoma F968 in R1401 smo uspešno namnožili pomnožek pričakovane velikosti iz vseh preiskovanih vzorcev talnih členonožcev in vretenčarjev, s čimer smo potrdili prisotnost bakterijske rDNK v vseh vzorcih.

Dele klamidijskih 16S rRNK smo odkrivali z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r. Pozitivne rezultate smo dobili pri 35 od skupno 46 vzorcev. Ker smo agarozne gele barvali z barvilom SYBER Gold, ki je bolj občutljiv, kot

etidijev bromid, smo poleg pričakovanih pomnožkov pri več vzorcih odkrili tudi pomnožke neprave velikosti.

V pregledanih vzorcih smo dobili nenavadno veliko število pozitivnih pomnožkov. To lahko kaže na to, da so klamidije veliko bolj razširjene, kot smo mislili. Do sedaj so opisani štirje klamidijski endosimbionti nevretenčarjev, ki jih ni možno gojiti v čisti kulturi in jih zato uvrščamo v kandidatne nove vrste ('*Candidatus*'). Prva je '*Candidatus* Rhabdochlamydia porcellionis' in okužuje kopenske enakonožne rake vrste *Porcellio scaber* (Kostanjšek in sod. 2004). '*Candidatus* Fritschea bemisiae' in '*Candidatus* Fritschea eriococci' (Thao in sod. 2003) so našli pri enakokrilcih *Eriococcus spurius* in *Bemisia tabaci*. Corsaro in sod. (2006) pa kot zadnji navajajo, da so našli klamidije vrste '*Candidatus* Rhabdochlamydia crassificans' pri ščurkih *Blatta orientalis*.

5.4 DOKAZOVANJE KLAMIDIJSKEGA IZVORA POMNOŽENIH DELOV RIBOSOMSKIH RNK

Da bi lahko dokazali, da so pomnožki specifičnih verižnih reakcij s polimerazo dejansko klamidijskega izvora, smo nameravali pomnožke sekvencirati in izvor sekvenc ugotavljati s primerjalno sekvenčno analizo. Da pa bi ugotovili, ali je v vsakem pomnožku v resnici ena sama klamidijska sekvenca in ne morda sekvence več različnih klamidijskih simbiotov, smo pomnožke najprej klonirali, nato pa klone primerjali z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE).

Z DGGE lahko ločimo pomnožke PCR, ki so enako dolgi, vendar imajo različne sekvence. Ločitev temelji na zmanjšanju elektroforetske mobilnosti delno denaturirane dsDNK molekule v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje linearni gradient denaturanta (mešanica uree in formamida). Ko DNK domena z najnižjo temperaturo tališča (T_m) doseže svojo T_m na specifični poziciji v denaturirajočem gelu, se migracija molekule praktično ustavi. Razlike v sekvenci znotraj teh domen pomenijo razlike v T_m , zato se DNK molekule z razlikami v sekvenci ustavijo na različnih mestih v gelu (Muyzer in Smalla, 1998; Muyzer in sod., 1993; Muyzer, 1999).

Da bi torej ugotovili ali vsebujejo pomnožki specifičnih verižnih reakcij, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r, po eno ali več različnih pomnoženih sekvenc, smo dva izbrana pomnožka klonirali. Oba pomnožka smo namnožili iz pajkov vrste *Dysdera ninnii*, ki sta se od vseh najmočneje pomnoževala in ob tem niso nastajali dodatni pomnožki nepravilnih velikosti.

Za analizo klonov z DGGE smo imeli na voljo 2 para začetnih oligonukleotidov, in sicer CHL_16S(270)f_dgge in CHL_16S(530)r ter CHL_16S(270)f in CHL_16S(530)r_dgge. Razlikujejo se po tem, da so pri prvem paru GC čeljusti na 5' začetnem oligonukleotidu, pri drugem paru pa na reverznem, 3' začetnem oligonukleotidu. Ker čeljust med potovanjem po gelu z linearnim gradientom denaturanta drži PCR pomnožek skupaj, se tekom elektroforeze pomnožki ne razprejo popolnoma do dveh enojnih verig. Tisti konec pomnožka, ki pa nima GC čeljusti, se razpira v odvisnosti od bazne sestave glede na denaturacijski pritisk na določenem mestu v gelu. Če hočemo, da bodo razlike v razpiranju pomnožkov različnih bakterij - ki se kažejo kot pojavljanje prog na različnih pozicijah na DGGE gelu - odraz dejanskih razlik v sekvenci sestavi, je potrebno GC čeljust postaviti na tisti začetni oligonukleotid, ki je bližje delu sekvence z manjšo heterogenostjo, bolj heterogeni deli sekvenc pa se bodo zato v denaturacijskem gradientu lahko razpirali. Razlike v razpiranju bodo odraz razlik v bazni sestavi teh sekvenc. Čeprav bi tudi glede na teorijo izbrali prvi par, pa je pri neznanih sekvencah teorijo težko uporabiti in je zato možen edino empiričen pristop. Tako smo se odločili, da bomo uporabili prvi par, saj smo za razliko od drugega para dobili dobro vidne proge na gelu.

Z analizo DGGE smo ugotovili, da se je pri vseh preučevanih klonih pojavil več kot en DGGE-PCR pomnožek. Vzrok multiplosti je verjetno v tem, da smo uporabili degenerirane začetne oligonukleotide, zaradi česar je možnih 24 različnih kombinacij. Proti 3' koncu obrnjen klamidijski DGGE začetni oligonukleotid CHL_16S(270)f_dgge je 2 x degeneriran (R in Y), proti 5' koncu obrnjen CHL_16S(530)r pa celo 3 x (W, R, K). Ker je prvi 2 x degeneriran, je to kombinacija štirih začetnih oligonukleotidov in ker je drugi 3 x degeneriran, je to kombinacija 6 začetnih oligonukleotidov, kar pomeni, da je skupno možnih 24 kombinacij. Ugotovili smo, da degenerirani DGGE začetni oligonukleotidi zagotovo dajo več prog na DGGE gelu, čeprav smo za matrico vzeli plazmidno DNK z

insertom klona, ki je vseboval eno samo sekvenco. Več prog, ne pa 24, je nastalo zato, ker je večina kombinacij degeneriranih začetnih oligonukleotidov omogočala pomnoževanje, nastali pomnožki pa so se, sicer malenkostno, po vsej verjetnosti ločili prav v območju začetnih oligonukleotidov. Ker ima teoretično DGGE sposobnost ločitve sekvenc, ki se razlikujejo za samo eno bazo, je normalno, da z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi dobimo več kot eno progo.

Primerjava nastalih DGGE profilov med preučevanimi kloni pa je pokazala, da imajo vsi kloni istega vzorca zelo podobne, celo skoraj enake profile. To kaže, da je v klonih prisoten en sam tip sekvence, večje število DGGE prog pa je dejansko posledica degeneriranosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

5.5 ANALIZA POMNOŽENIH IN KLONIRANIH KLAMIDIJSKIH RIBOSOMSKIH SEKVENC

Na podlagi analize klonov z DGGE smo izbrali šest klonov in sekvencirali njihove inserte z deli genov za 16S rRNK. Dobili smo 5 čitljivih kromatogramov iz katerih smo dobili sekvence začetnih delov genov za 16S rRNK. Tako dobljenim sekvencam smo poiskali najbolj podobne sekvence v bazah podatkov. Primerjava je pokazala, da so vse sekvence najbolj podobne klamidijским sekvencam.

V vseh petih primerih je bila najbolj podobna sekvenca iz bank podatkov tista iz '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Ne moremo trditi, da so kloni v resnici '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', vsekakor pa so omenjenemu predstavniku klamidij zelo podobne. Sekvence klonov so namreč kratke, zato bi za bolj zanesljiv rezultat sekvenčne analize morali pridobiti daljše pomnožke ribosomskih genov. Zanesljivost napovedi je namreč manjša, če je sekvenca krajša.

Želeli smo tudi ugotoviti koliko so si sekvence podobne med seboj. Zato smo jih vnesli v program za poravnavo in primerjavo sekvenc ClustalX ter pogledali kje in koliko so si različne. Poravnava sekvenc nam je pokazala, da v klonih nimamo ene same sekvence, ampak več različnih, ki pa so si zelo podobne in so verjetno v resnici vse klamidijske.

5.6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da najprimernejša metoda za izolacijo mikrobne DNK iz preučevanih vzorcev ni nujno tista, ki omogoča največji izplen mikrobne DNK. Čeprav smo lahko iz izoliranih DNK uspešno pomnoževali dele bakterijskih ribosomskih genov, ne glede na način izolacije DNK, je analiza DGGE pokazala, da so nekatere metode primernejše od drugih. Metodi, ki sta vključevali fizično razbijanje celic z ultrazvokom oz. stresanjem mikrobnih celic v krogličnem stresalcu, sta namreč omogočili nastanek večjega števila prog na DGGE gelu, kar nakazuje na možnost, da sta omogočili razbijanje celic več različnih pripadnikov mikrobne združbe v vzorcu.
- Preverili smo specifičnost nekaterih začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidnih sond in nekatere primerno modificirani. Ugotovili smo, da je začetni oligonukleotid CHL_16S(270)f daleč najbolj specifičen, saj teoretično omogoča namnoževanje skoraj vseh klamidijских sekvenc, ki so bile na dan preverjanja dostopne v specializirani bazi sekvenc RDP in so ustrezale omejevalnim kriterijem, istočasno pa ne nalega na nobeno neklamidijsko sekvenco. Ostali oligonukleotidi niso tako specifični. Od široko specifičnih oligonukleotidov, ki smo jih v verižnih reakcijah s polimerazo kombinirali z začetnim oligonukleotidom CHL_16S(270)f, se je kot najprimernejši izkazal CHL_16S(530)r, ki omogoča namnoževanje velikega števila neklamidijskih sekvenc a tudi večine klamidijских sekvenc. Slabost izbranega para oligonukleotidov je relativno majhna dolžina pomnožene sekvence in posledično nezanesljiva primerjalna sekvenčna in filogenetska analiza.
- Na naše dokajšnje presenečenje smo ugotovili, da smo lahko kar pri 75 % preučeni vzorcih specifično namnožili domnevne klamidijске sekvence. Smo pa poleg pomnožkov pričakovane velikosti pri večini vzorcev opazili tudi daljše ali krajše pomnožke, kar nakazuje neoptimalne razmere v katerih je potekala verižna reakcija s polimerazo. Naši rezultati nakazujejo, da so klamidije pri nevretenčarji zelo pogosto prisotne, ne poznamo pa še njihove prave in točne filogenetske umeščenosti.

- Pomnožke iz dveh pozitivnih vzorcev smo klonirali in z DGGE metodo ugotovili, da so bili v vsaki genski knjižnici prisotni kloni z enakim tipom sekvence. Se je pa izkazalo, da je uporaba specifičnih, degeneriranih začetnih oligonukleotidov za metodo DGGE neustrezna, ker degeneriranost oligonukleotidov omogoča nastanek velikega števila pomnožkov in oteži primerjalno analizo.
- Primerjalna sekvenčna analiza dela ribosomskih genov dveh izbranih pomnožkov je potrdila, da gre v obeh primerih za sekvenco skoraj identično sekvenci '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Šele analiza večjega dela sekvenc ribosomskih genov iz obeh vzorcev bi lahko potrdila, kako sorodni so si organizmi iz zadka pajka *Dysdera ninnii* s klamidijo iz črevesa izopodnega raka *Porcellio scaber*, t.j. '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

6 POVZETEK

Nedavno so v prebavnem traktu kopenskih enakonožnih rakov opisali predstavnike doslej še neznane skupine klamidij, ki predstavlja samostojno evolucijsko vejo v redu *Chlamydiales*. Odkrili so še druge nove klamidije v žuželkah, obstaja pa tudi možnost, da je neznanih klamidij v drugih živalskih vrstah še veliko. Ni pa znano, kateri so še drugi možni gostitelji teh mikroorganizmov in kakšna je genetska pestrost skupin, ki jim te klamidije pripadajo.

Na tesno povezanost bakterij in gostitelja kaže znotrajcelični način življenja klamidij. Gostitelj in simbiot sta zelo tesno povezana, zato klamidij s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami ne moremo osamiti in gojiti v laboratorijskih razmerah. Zato smo se odločili uporabiti direktne molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji in analizi nukleinskih kislin.

Naš namen je bil iz vzorcev različnih živali osamiti skupno mikrobno DNK in z verižno reakcijo s polimerazo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ugotoviti, ali so v njih prisotne klamidijske sekvence. V kolikor bi takšne sekvence odkrili, smo jih nameravali filogenetsko preučiti in ugotoviti, ali gre za že znane ali nove filotipe.

Tako smo iz vzorcev dveh živali najprej s štirimi različnimi metodami izolirali skupno mikrobno DNK, izmerili njeno koncentracijo in preverili njeno kakovost. Nato smo z začetnimi oligonukleotidi, ki prilegajo na evolucijsko ohranjene dele bakterijskih ribosomskih genov, iz izolirane DNK v verižni reakciji s polimerazo pomnožili dele ribosomskih genov ter PCR pomnožke analizirali z gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE). Na podlagi količine in kvalitete izolirane DNK, učinkovitosti pomnoževanja dela bakterijskih genov za 16S rRNK ter ločevanja tako dobljenih pomnožkov z DGGE, smo izbrali najprimernejšo metodo za izolacijo DNK.

Z metodo, ki mikrobne celice razbija z ultrazvokom in nato za čiščenje mikrobne DNK izkorišča CTAB smo nato izolirali DNK iz 22 nevretenčarskih vzorcev, 22 vzorcev odvzetih pri različnih vretenčarjih in dveh vzorcev aktivnega blata iz centralne čistilne

naprave Domžale Kamnik. Nato smo preverili kvaliteto izolirane DNK in njeno primernost za nadaljnje molekularne manipulacije tako, da smo iz vseh DNK s široko specifičnima bakterijskima začetnima oligonukleotidoma namnožili dele ribosomskih genov. V naslednjem koraku smo z za klamidije specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih ustrezno modificirali na osnovi prej znanih in v literaturi objavljenih začetnih oligonukleotidov ali sond, pomnožili še dele klamidijevih ribosomskih genov. Pomnožke ustrezne velikosti (260 bp) smo uspešno pomnožili pri 35 od skupno 46 vzorcev. Da bi ugotovili, ali izvirajo PCR pomnožki iz ene ali več različnih klamidijevih sekvenc, smo dva izbrana pomnožka molekularno klonirali in klone analizirali z DGGE. Analiza je pokazala veliko homogenost sekvenc v različnih klonih pomnožkov. Pojavilo pa se je dokaj veliko število pasov, ki so bili tudi različno močno vidni, čeprav smo pričakovali le en pas pri vsakem vzorcu. Vzrok multiplosti je najbrž v tem, da smo uporabili degenerirane začetne oligonukleotide, zaradi česar je možnih več različnih kombinacij. Kljub temu pa uporabljeni sistem očitno omogoča ločevanje med različnimi kloniranimi pomnožki, ki se ločijo v zelo majhnem številu nukleotidov v sekvenci.

Na podlagi analize klonov z DGGE smo naključno izbrali šest kolonov (po tri iz vsakega pomnožka) in sekvencirali njihove inserte z deli genov za 16S rRNK. Dobili smo pet čitljivih in kvalitetnih kromatogramov. Dolžina vseh sekvenc je 217 nukleotidov (brez začetnih oligonukleotidov), delež GC pa se giblje med 50,7 in 51,2 odstotki. Tako dobljenim sekvencam smo z algoritmom BlastN poiskali najbolj podobne sekvence v bazah podatkov. Primerjava je pokazala, da so vse sekvence najbolj podobne klamidijevim sekvencam, najbolj pa sekvenci gena za 16S rRNA *Rhabdochlamydia porcellionis*, kjer se podobnost giblje med 92 in 96 odstotki.

Sekvence smo vnesli tudi v program za poravnavo in primerjavo sekvenc ClustalX, da bi ugotovili, kako so si sekvence podobne med seboj. Poravnava sekvenc nam je pokazala, da so bile v klonih prisotne različne sekvence, ki pa so se le malo razlikovale in so bile vse klamidijevskega izvora.

7 VIRI

- Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews*, 95, 1: 143-169
- Amann R., Springer N., Schönhuber W., Ludwig W., Schmid E. N., Müller K. D., Michel R. 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoebae* related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1: 115-121
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore 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.
- Collingro A., Poppert S., Heinz E., Smits-Esser S., Essig A., Schweikert M., Wagner M. 2005. Recovery of an environmental chlamydia strain from activated sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp. *Microbiology*, 151: 301-309
- Corsaro D., Valassina M., Venditti D. 2003. Increasing diversity within chlamydiae. *Critical Reviews in Microbiology*, 29: 37-78
- Corsaro D., Venditti D., Valassina M. 2002. New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. *Research in Microbiology*, 153: 563-567
- Corsaro D., Venditti D. 2004. Emerging chlamydial infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 75-106
- Corsaro D., Thomas V., Goy G., Venditti D., Radek R., Greub G. 2006. 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). *Systematic and Applied Microbiology*, v tisku
- Crespo S., Zarza C., Padros F., Marin de Mateo M. 1999. Epitheliocystis agents in sea bream *Sparus aurata*: morphological evidence for two distinct chlamydia-like development cycles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 61-72
- Drobne D., Štrus J., Žnidaršič N., Zidar P. 1999. Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 113-119
- Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 2: 415-440

- Everett K.D.E., Thao M., Horn M., Dyszynski G.E., Baumann P. 2005: Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts '*Candidatus Fritschea bemesiae*' strain Falk and '*Candidatus Fritschea eriococci*' strain Elm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1581-1587
- Felsenstein J. 2002. PHYLIP (Phylogenetic inference package), version 3.6. Seattle, Washington, USA, Department of Genetics, University of Washington.
- Ferme D. 2003. Vpliv rastlinskih izvlečkov in monezina na strukturo vampne mikrobnе združbe v kontinuirani kulturi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 33-41
- Groff J.M., LaPatra S.E., Munn R.J., Anderson M.L., Osburn B.I. 1996. Epitheliocystis infection in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): antigenic and ultrastructural similarities of the causative agent to the chlamydiae. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8: 172-180
- Harshbarger J.C., Chang S.C., Otto S.V. 1977. Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Cheasepeake Bay bivalves. *Science*, 196: 666-669
- Homer B.L., Jacobson E.R., Schumacher J., Scherba G. 1994. Chlamydiosis in mariculture-reared green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 31: 1-7
- Horn M., Fritsche T.R., Gautom R.K., Schleifer K.-H., Wagner M. 1999: Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology*, 1: 357-367
- Horn M., Wagner M., Muller K.-D., Schmid E. N., Fritsche T.R., Schleifer K.-H., Michel R. 2000. *Neochalmydia hartmanellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachalmydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmanella vermiformis*. *Microbiology*, 146: 1231-1239
- Horn M., Wagner M. 2001. Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 1: 71-74
- Jacobson E.R., Telford S.R. 1990. Chlamydial and poxvirus infections of circulating monocytes of a flap-necked chameleon (*Chamaeleo dilepis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 26: 572-577
- Kahne S., Dvoskin B., Mathias M., Friedman M.G. 2001. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4789-4795
- 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. 2002. Indigena bakterijska flora v prebavilu kopenskega raka enakonožca *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 121 str.
- Kostanjšek R., Avguštin G., Drobne D., Štrus J. 2004. 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 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods, May 2001: Sfenthourakis S (ed.). Leiden: Koninklijke Brill NV: 103-120
- Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004. 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 543-549
- Kostanjšek R., Štrus J., Lapanje A., Avguštin G., Rupnik M., Drobne D. 2006. Intestinal microbiota of terrestrial isopods. V: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates (Soil biology, 6). König H., Varma A. (eds.). Berlin, Springer: 115-131
- Liu Wen-Tso, Mirzabekov A.D., Stahl D.A. 2001. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. Environmental Microbiology, 3, 10: 619-629
- Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71, 2: 491-499
- Mini-beadbeater 3110BX 2006, Bartsville, Biospec Products, ZDA.
http://www.glenmills.com/product_showcase/cell-bead-mini_beater.shtml (May 2006): 1 str.
- Morel G. 1976. Studies of *Porochlamydia buthi* g.n., sp.n. an intracellular pathogen of the scorpion *Buthus occitanus*. Journal of Invertebrate Pathology, 26: 167-175
- Moulder J.W. 1984. Order *Chlamydiales*. V: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol.1. Krieg N. R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, The Williams & Wilkins Co. : 729-739
- MSE Soniprep 150: A SANYO MSE Ultrasonic Disintegrator. 2001. Palisades Park, New Jersey, Integrated Services, TCP Inc. (Avgust 2004)
<http://www.integratedservices.com/soniprep.htm> (2006):1 str.
- Murray R.G.E., Stackebrandt E. 1995. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 186-187
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 2: 371-322

- Muyzer G., De Wall E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141
- Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S., Maniatis T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acid Research*, 13: 3131-3145
- National Center for Biotechnology Information - NCBI. 1993. Bethesda, National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine (27. september 2006)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (October 2006): 4 str.
- Network protein sequence analysis. 1998. Lyon-Gerland, Institute of Biology and Chemistry of Proteins (July 2006)
<http://npsa-pbil.ibcp.fr/> (8. september 2006): 3 str.
- Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. 1984. Queen Mary University of London, Department of Chemistry (March 2006)
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html> (2006): 2 str.
- O'Brien T.L., MacLeod R. 1983. Description of *Chlamydia*-like microorganisms in *Hydra viridis* and an initial characterization of the relationship between microorganisms and host. *Cytobios*, 36: 141-151
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337-365
- Olsen, G.J., Woese, C.R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*, 7: 113-123
- Osaki H. 1973. Electron microscopic observations of chlamydia-like microorganisms in hepatopancreas cells of the spider *Coelotes luctuosus*. *Acta Arachnologica*, 24: 23-36
- Ossewaarde J.M., Meijer A. 1999. Molecular evidence for the existence of additional members of the order *Chlamydiales*. *Microbiology*, 145: 411-417

- Ribosomal Database Project II (RDP). 2006. Michigan, Center for Microbial Ecology, Michigan State University (May 2006)
<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (May 2006): 3 str.
- Savage J.M. 1995. Systematics and the biodiversity crisis – there is an urgent need for accelerated accumulation of knowledge about biodiversity. *BioScience*, 45: 673-679
- Schmalenberger A., Tebbe C.C. 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its nontransgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 29-37
- Thao M. L., Baumann L., Hess J. M., Falk B. W., Ng J. C. K., Gullan P. J., Baumann P. 2003. Phylogenetic evidence of two new insect-associated chlamydia of the family *Simkaniaceae*. *Current Opinion in Microbiology*, 47: 46-50
- The chlamydial developmental cycle in pictures. 2002. Southampton, School of Medicine, University of Southampton (5. March 2006)
http://www.chlamydiae.com/docs/biology/biol_devcycle.asp (October 2005): 1 str.
- The comprehensive reference and education site to Chlamydia and the chlamydiae. 2002. Southampton, University of Southampton, School of Medicine (5. March 2006)
http://www.chlamydiae.com/restricted/docs/Methods/tech_speciation_pcr.asp (May 2005): 1 str.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Wen-Hsiung L., Graur D. 1990. Molecular phylogenetics. V: Fundamentals of molecular evolution. Wen-Hsiung L., Graur D. (eds.). Massachusetts, Sinauer Associates Incorporated: 99-135

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu iskrena hvala, da mi je omogočil izvedbo diplomske naloge ter za vso pomoč in ideje.

Prav tako hvala somentorju doc. dr. Roku Kostanjšku za vzorce tkiv talnih členonožcev ter za pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Dr. Alenki Dovč z Veterinarske fakultete hvala za vzorce tkiv vretenčarjev.

Darji se iskreno zahvaljujem za pomoč, optimizem in vzpodbude pri delu ter vsem v laboratoriju za prijetno družbo.

Najlepša hvala mojima staršema, ki sta verjela vame, prav tako pa tudi tastu in tašči – vsi ste mi pomagali in niste obupali nad mano.

Iskrena hvala mojemu možu, s katerim sva v tem času preživela dobre in slabe trenutke, ki je prenašal mojo slabo voljo ter me vzpodbujal v najslabših dnevih.

In pa seveda mojima zlatima otrokoma, Juliji in Jaku, preprosto zato, ker ju imam in zaradi katerih sem vztrajala do konca.