

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Larisa ŽNIDARŠIČ BOVHAN

**ODRAZ ŠTEVILA OPERONOV *rrn* V
ZASTOPANOSTI GENOV ZA 16S rRNA
POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH VRST V GENSKIH
KNJIŽNICAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Larisa ŽNIDARŠIČ BOVHAN

**ODRAZ ŠTEVILA OPERONOV *rrn* V ZASTOPANOSTI GENOV ZA
16S rRNA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH VRST V GENSKIH
KNJIŽNICAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**A REFLECTION OF *rrn* OPERON COPY NUMBER IN
REPRESENTATION OF 16S rRNA GENES FOR INDIVIDUAL
BACTERIAL SPECIES IN THE GENE LIBRARIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko v Domžalah.

Po sklepu Študijske komisije Univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Tomaž Accetto, za recenzentko doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja ter za predsednika komisije prof. dr. David Stopar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. David Stopar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	doc. dr. Tomaž Accetto Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica:	doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Larisa Žnidaršič Bovhan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25:602.6:575.112(043)=163.6
KG	molekularna genetika/mikrobne združbe/bioinformatika/prebavni trakt/genske knjižnice/število operonov <i>rrn</i> /16S rDNA/ <i>Bacteroidetes/Firmicutes/Bacteroides vulgatus</i> DSM 1447 ^T / <i>Prevotella ruminicola</i> Bryant 23 ^T / <i>Ruminococcus albus</i> 7 ^T
AV	ŽNIDARŠIČ BOVHAN, Larisa
SA	ACCETTO, Tomaž (mentor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	ODRAZ ŠTEVILA OPERONOV <i>rrn</i> V ZASTOPANOSTI GENOV ZA 16S rRNA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH VRST V GENSKIH KNJIŽNICAH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVI, 89 str., 44 pregl., 27 sl., 6 pril., 174 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Število genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA je na nivoju bakterijskih vrst raznoliko. Ocene številnosti posameznih vrst in posledično okolske raznolikosti, ki se odražajo v deležu genov, ki kodirajo 16S rRNA, so zato, ob neupoštevanju omenjenega dejstva, lahko narobe ovrednotene. Z <i>in silico</i> analizo števila operonov <i>rrn</i> v genomih bakterijskih vrst iz debel <i>Bacteroidetes</i> in <i>Firmicutes</i> , smo kljub hitro rastočim podatkovnim bazam, nabrali le manjši vzorec (58 sevov) kvalitetne genomske informacije. Dokazali smo, da je število genov, ki kodirajo 16S rRNA znotraj in med debloma raznovrstno, a kljub temu se kaže tendenca, da prebavni trakt živali in človeka naseljujejo bakterije z večjim številom genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA. Eksperimentalno smo zato že zeleli ugotoviti, v kolikšni meri se število operonov <i>rrn</i> odraža v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah. Naredili smo dve genski knjižnici iz ekvimolarnih mešanic kromosomske DNA dveh vrst (<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>P. ruminicola</i> 23, <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>R. albus</i> 7). Število operonov <i>rrn</i> vrst <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>P. ruminicola</i> 23 se je kazalo v ustreznom razmerju genov, ki kodirajo 16S rRNA. A kljub ustreznemu zastopstvu je še prenagljeno trditi, da bi se trend izkazoval v knjižnicah genov, ki kodirajo 16S rRNA kateregakoli para bakterijskih vrst. To smo pokazali z odstopanjem v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>R. albus</i> 7 v genskih knjižnicah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.25:602.6:575.112(043)=163.6
CX molecular genetics/microbial communities/bioinformatics/gastrointestinal tract/gene library/*rrn* operon copy number/16S rDNA/*Bacteroidetes/Firmicutes/Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T/*Prevotella ruminicola* Bryant 23^T/*Ruminococcus albus* 7^T
AV ŽNIDARŠIČ BOVHAN, Larisa
AA ACCETTO, Tomaž (supervisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2012
TY A REFLECTION OF *rrn* OPERON COPY NUMBER IN REPRESENTATION OF 16S rRNA GENES FOR INDIVIDUAL BACTERIAL SPECIES IN THE GENE LIBRARIES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XVI, 89 p., 44 tab., 27 fig., 6 ann., 174 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The number of 16S ribosomal genes is diverse at the level of bacterial species. Estimated number of individual species and consequitively ecological diversity derived from proportion of 16S rRNA genes may be wrongly evaluated if failed to comply with the mentioned fact. Despite the fastly growing genomic database, we found only a small sample size (58 strains) of high quality genomic information in genomes of bacterial species from phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* using *in silico* analysis of *rrn* operons. We have proven that the number of 16S rRNA genes within and between phylums is diverse, however there is a tendency that gastrointestinal tract of animals and humans is being inhabited by the bacteria with a large number of 16S ribosomal RNA genes. Therefore, we wanted to determine experimentaly to what extent the number of *rrn* operon reflecs in representation of 16S ribosomal genes of each bacterial species in the gene libraries. We made two gene libraries from equimolar mixtures of chromosomal DNA of two species (*B. vulgatus* DSM 1447 and *P. ruminicola* 23, *B. vulgatus* DSM 1447 and *R. albus* 7). The number of *rrn* operon of the *B. vulgatus* DSM 1447 and *P. ruminicola* 23 species was indicated in a corresponding ratio for 16S rRNA genes. However, it is too early to say that the trend is being reflected in ribosomal genes libraries of any pair of bacterial species. This has been shown with the variations in the representation of the genes for 16S rRNA genes of *R. albus* 7 within gene libraries.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
SLOVARČEK	XVI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MOLEKULARNO BIOLOŠKE METODE ZA ANALIZO	
MIKROBNE ZDRUŽBE	2
2.2 MOLEKULARNI KRONOMETER	2
Gen, ki kodira 16S rRNA kot molekularni kronometer	3
Število operonov <i>rrn</i> v genomu	4
Organizacija genov v operonu <i>rrn</i>	5
Regulacija izražanja operonov <i>rrn</i>	6
Heterogenost med operoni <i>rrn</i> v genomu	7
2.2.1 MIKROBNA ZDRUŽBA V PREBAVNEM TRAKTU SESALCEV	9
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Laboratorijska oprema, pripomočki, steklovina in potrošni material	12
Laboratorijska oprema	12
Laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material	12
3.1.2 Kemikalije, raztopine, barvili, antibiotika, encimi in komercialno dostopni kompleti	13
3.1.3 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine	14
3.1.4 Večkomponentne raztopine in pufri	15
3.1.5 Gojišča in mediji za rast bakterijskih celic	15
Gojišče LB	15
3.1.5.1 Tekoče in trdno gojišče LB	15
3.1.5.2 Tekoči pufer LB za zamrzovanje sevov	16
3.1.5.2 Modificirano gojišče M2	16
3.1.6 Bakterijski sevi	17
3.1.6.1 Izbrani bakterijski sevi	17
3.1.6.2 Kompetenten bakterijski sev <i>Escherichia coli</i> TOP10	18
3.1.7 Plazmida	18
3.1.7.1 Plazmid pRH3	18

3.1.7.2	Plazmid pJET1.2/blunt	18
3.1.8	Začetni oligonukleotidi	19
3.2	METODE	22
3.2.1	Bioinformacijska analiza števila operonov <i>rrn</i>	22
3.2.2	Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	25
3.2.2.1	Anaerobno gojenje izbranih bakterijskih sevov	25
3.2.2.2	Spremljanje rasti bakterijskih kultur v tekočem gojišču M2	25
3.2.2.3	Spiranje bakterijskih kultur	26
3.2.2.4	Direktno štetje bakterijskih celic s pretočno citometrijo	26
3.2.2.5	Izolacija kromosomske DNA	27
3.2.2.6	Priprava agaroznega gela in horizontalna gelska elektforeza	28
3.2.2.7	Čiščenje in koncentriranje izolirane DNA	29
3.2.2.8	Merjenje koncentracije izolirane kromosomske DNA	29
3.2.2.9	Ekvimolarni alikvoti izolirane kromosomske DNA	30
3.2.2.10	Verižna reakcija s polimerazo	31
3.2.2.11	Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo	34
3.2.2.11.1	Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo z restrikcijsko endonukleazo <i>AvaII</i>	34
3.2.2.11.2	Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	35
3.2.2.12	Izdelava genskih knjižnic	36
3.2.2.12.1	Spremljanje rasti bakterijskega seva <i>E. coli</i> TOP10 v tekočem gojišču LB_{Sm}	37
3.2.2.12.2	Priprava kompetentnih celic	37
3.2.2.12.3	Pozitivna kontrolna transformacija	37
3.2.2.12.4	Povezovanje tarčnih odsekov DNA s plazmidnim vektorjem	38
3.2.2.12.5	Transformacija	39
3.2.2.12.6	Izolacija plazmidne DNA	39
3.2.2.12.7	Cepitev izolirane plazmidne DNA	40
3.2.2.12.8	Izbor kolonij transgenih celic za genske knjižnice	40
3.2.2.12.9	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	41
3.2.2.12.9.1	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo	41
3.2.2.12.9.2	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restrikcijo analizo	41
3.2.2.13	Določanje zaporedja genov, ki kodirajo 16S rRNA in primerjalna analiza zaporedij vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedij v podatkovni bazi	43
3.2.2.13.1	Določanje zaporedij genov, ki kodirajo 16S rRNA	43
3.2.2.13.2	Primerjalna analiza zaporedij vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedij v podatkovni bazi	44
4	REZULTATI	45
4.1	BIOINFORMACIJSKA ANALIZA ŠTEVILA GENOV, KI KODIRAJO 16S rRNA	45

4.1.1	Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo prebavni trakt	45
4.1.2	Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo debelo črevo	51
4.2	ANALIZA ZASTOPANOSTI GENOV, KI KODIRAJO 16S rRNA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH VRST V GENSKIH KNJIŽNICAH	53
4.2.1	Mikroskopiranje nativnih preparatov	53
4.2.2	Analiza meritev števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom	54
4.2.3	Izolirana kromosomska DNA	55
4.2.4	Merjenje koncentracije izolirane kromosomske DNA	55
4.2.5	Analiza uspešnosti pomnoževanja genov, ki kodirajo 16S rRNA iz osamljene kromosomske DNA	56
4.2.6	Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA	57
4.2.6.1	Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA cepljenih z restriktijsko endonukleazo <i>AvaII</i>	57
4.2.6.2	Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, cepljenih z restriktijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	59
4.2.7	Pozitivna kontrolna transformacija	60
4.2.8	Restriktijska analiza rekombinantne DNA, cepljene z restriktijsko endonukleazo <i>XbaI</i>	60
4.2.9	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	62
4.2.9.1	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo	62
4.2.9.2	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restriktijsko analizo	64
4.2.10	Razmerje genov, ki kodirajo 16S ribosomalno RNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	67
4.2.10.1	Knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>P. ruminicola</i> 23	67
4.2.10.2	Knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>R. albus</i> 7	67
4.2.11	Primerjalna analiza določenih nukleotidnih zaporedji vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedji v podatkovni bazi	68
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	69
5.1	RAZPRAVA	69
5.1.1	Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA	69
5.1.2	Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	71
5.1.2.1	Analiza meritev s pretočnim citometrom in mikroskopskih preparatov	71
5.1.2.2	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	72

5.1.2.2.1	Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo	72
5.1.2.2.2	Ugotavljenje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restriksijsko analizo	73
5.1.2.3	Primerjalna analiza določenih nukleotidnih zaporedji vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedji v podatkovni bazi	73
5.1.2.4	Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah	73
5.2	SKLEPI	75
6	POVZETEK	76
7	VIRI	
	ZAHVALA	
	PRILOGE	78

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Pregl. 1: Zahteve, ki jih mora izpolnjevati molekularni kronometer (Eisen, 1995; Woese, 2000)	2
Pregl. 2: Različno število operonov <i>rrn</i> znotraj vrst (Fogel in sod., 1999; Acinas in sod., 2004)	5
Pregl. 3: Uporabljena laboratorijska oprema	12
Pregl. 4: Uporabljeni laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material	12
Pregl. 5: Uporabljene kemikalije, raztopine, antibiotika in barvili	13
Pregl. 6: Uporabljeni encimi in pufri	14
Pregl. 7: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti	14
Pregl. 8: Sestavine večkomponentnih sestavin in pufrov, ki smo jih uporabljali pri delu	15
Pregl. 9: Sestavine za pripravo gojišča LB	16
Pregl. 10: Sestavine za pripravo pufra LB za zamrzovaje sevov	16
Pregl. 11: Sestavine za pripravo modificiranega gojišča M2	17
Pregl. 12: Bakterijske sevi in razlogi za njihovo vključitev v poskus	18
Pregl. 13: Par široko specifičnih začetnih oligonukleotidov in njune lastnosti	20
Pregl. 14: Lastnosti para široko specifičnih začetnih oligonukleotidov	20
Pregl. 15: Pari vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov in njihove lastnosti	21
Pregl. 16: Par začetnih oligonukleotidov, s prijemališčem na plazmidu pJET1.2/blunt, in njune lastnosti	22
Pregl. 17: Lastnosti para začetnih oligonukleotidov, ki imata prijemališče na plazmidu pJET1.2/blunt	22
Pregl. 18: Maksimalna globina jamice glede na površino in volumen agaroznega gela	28
Pregl. 19: Molska masa deoksinukleotidov	30
Pregl. 20: Dolžine kromosomov in deleži dušikovih baz	30
Pregl. 21: Molska masa dvojnoverižne kromosomske DNA v bakterijski celici	31
Pregl. 22: Ekvimolarni razmerji kromosomske DNA med izbranimi bakterijskimi vrstami	31
Pregl. 23: Volumni alikvotov z enakim številom kromosomov vsake vrste	31
Pregl. 24: Protokol verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz osamljene kromosomske in plazmidne DNA	32
Pregl. 25: Protokol verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz knjižnic transgenih celic	32
Pregl. 26: Reagenti in njihova koncentracija v reakcijski mešanici verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz osamljene kromosomske DNA in rekombinantne DNA iz knjižnic transgenih celic	33
Pregl. 27: Reagenti in njihove koncentracije v reakcijski mešanici verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz plazmidne DNA	33
Pregl. 28: Prepoznavno zaporedje restrikcijske endonukleaze <i>AvaII</i> in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi	34
Pregl. 29: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo <i>AvaII</i>	34

Pregl. 30: Prepoznavno zaporedje restriktivne endonukleaze <i>TaqI</i> in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi	35
Pregl. 31: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo <i>TaqI</i>	36
Pregl. 32: Prepoznavno zaporedje restriktivne endonukleaze <i>XbaI</i> , mesto cepitve plazmida pJET1.2/blunt in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi	40
Pregl. 33: Dolžina lineariziranega plazmidnega vektorja pJET1.2/blunt z vključkom in brez njega	40
Pregl. 34: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo <i>AvaII</i>	41
Pregl. 35: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo <i>TaqI</i>	42
Pregl. 36: Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA in velikost kromosoma bakterijskih sevov iz debla <i>Bacteroidetes</i>	46
Pregl. 37: Število ribosomskih genov in velikost kromosoma bakterijskih sevov iz debla <i>Firmicutes</i>	46
Pregl. 38: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije izolirane kromosomske DNA	55
Pregl. 39: Rast transgenih celic na selekcijskem gojišču LB _{Amp}	60
Pregl. 40: Število genov, ki kodirajo 16S rRNA v treh ponovitvah genskih knjižnic (<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>P. ruminicola</i> 23)	67
Pregl. 41: Razmerje števila operonov <i>rrn</i> <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 : <i>P. ruminicola</i> 23 v treh ponovitvah genskih knjižnic	67
Pregl. 42: Število genov, ki kodirajo 16S rRNA v treh ponovitvah genskih knjižnic (<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>R. albus</i> 7)	67
Pregl. 43: Razmerje števila operonov <i>rrn</i> <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 : <i>R. albus</i> 7 v treh ponovitvah genskih knjižnic	68
Pregl. 44: Najbolj podobna zaporedja v podatkovni bazi nukleotidnih zaporedij po analizi iskalnega algoritma	68

KAZALO SLIK

str.

Sl. 1: Delež števila operonov <i>rrn</i> v genomih bakterijskih vrst (Acinas in sod., 2004: 2632)	4
Sl. 2: Število operonov <i>rrn</i> (stolpci) v genomih bakterijskih vrst in delež genomov (linea), ki imajo vse kopije gena, ki kodira 16S rRNA identične (Acinas in sod., 2004: 2633)	8
Sl. 3: Shematski prikaz poteka dela	30
Sl. 4: Tipična oblika UV-vidnega spektra absorbcije DNA (Polyanichko in sod., 2004)	29
Sl. 5: Analiza dolžin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (<i>B.v.</i>), <i>P. ruminicola</i> 23(<i>P.r.</i>) in <i>R. albus</i> 7 (<i>R.a.</i>) cepljenih z endonukleazo <i>AvaII</i>	35
Sl. 6: Analiza dolžin odsekov genov, kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (<i>B.v.</i>) in <i>R. albus</i> 7 (<i>R.a.</i>) cepljenih z endonukleazo <i>TaqI</i>	36
Sl. 7: Analiza dolžin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (<i>B.v.</i>) in <i>P. ruminicola</i> 23 (<i>P.r.</i>) cepljenih z endonukleazo <i>AvaII</i>	42
Sl. 8: Analiza dolžin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (<i>B.v.</i>) in <i>R. albus</i> 7 (<i>R.a.</i>) cepljenih z endonukleazo <i>TaqI</i>	43
Sl. 9: Okvir z ročaji za ševilo genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo prebavni trakt, glede na bakterijski debli	49
Sl. 10: Diagram povprečij števila genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo prebavni trakt, glede na bakterijski debli	50
Sl. 11: Razsevni grafikon dolžine genoma in števila genov, ki kodirajo 16S rRNA	50
Sl. 12: Okvir z ročaji za ševilo genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo debelo črevo, glede na bakterijski debli	51
Sl. 13: Diagram povprečij števila genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo debelo črevo, glede na bakterijski debli	52
Sl. 14: Nativni preparat <i>R. albus</i> 7 (A) in <i>P. ruminicola</i> 23 (B)	53
Sl. 15: Nativni preparat <i>B. vulgatus</i> DSM 1447	53
Sl. 16: Dvodimenzionalni točkovni grafikon meritev števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom	546
Sl. 17: Elektroforezna ločitev izolirane kromosomske DNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (<i>B.v.</i>), <i>P. ruminicola</i> 23 (<i>P.r.</i>) in <i>R. albus</i> 7 (<i>R.a.</i>)	55
Sl. 18: Analiza uspešnosti pomnoževanja genov, ki kodirajo 16S rRNA v verižni reakciji s polimerazo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) iz osamljene kromosomske DNA	56
Sl. 19: Elektroforezna slika delne cepitve pomnože 16S ribosomalne DNA z restrikcijsko endonukleazo <i>AvaII</i>	57
Sl. 20: Prepoznavno nukleotidno zaporedje restrikcijske endonukleaze <i>AvaII</i> (5'-GGGCC-3')	58
Sl. 21: Elektroforezna slika delne cepitve pomnožene 16S rDNA z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	59
Sl. 22: Analiza cepitve rekombinantne DNA, cepljene z restrikcijsko endonukleazo <i>XbaI</i>	61

Sl. 23: Analiza dolžin očiščenih pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA (<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>P. ruminicola</i> 23) pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s pari ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov	62
Sl. 24: Analiza dolžin očiščenih pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA (<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 in <i>R. albus</i> 7), pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s pari ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov	63
Sl. 25: Elektroforezna slika delne cepitve očiščenih pomnoženih genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 z restrikcijsko endonukleazo <i>AvaII</i>	64
Sl. 26: Elektroforezna slika cepitve pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA <i>P. ruminicola</i> 23 z restrikcijsko endonukleazo <i>AvaII</i>	65
Sl. 27: Elektroforezna slika delne cepitve pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA <i>B. vulgatus</i> DSM 1447 (K1) in <i>R. albus</i> 7 (K2) z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	66

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Raztopina fragmentov DNA umerjenega velikostnega standarda
- Priloga B: Karta plazmida pJET1.2/blunt z označenimi nekaterimi pomembnejšimi mesti
- Priloga C: Genomske karte in mesta genov, ki kodirajo ribosomsko RNA v genomih
- Priloga D: Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA v smeri 5'→3' formata
GenBank
- Priloga E: Dolžina genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debel
Bacteroidetes in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka
- Priloga F: Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debla
Bacteroidetes in *Firmicutes*, ki naseljujejo debelo črevo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

#	kataloška številka
A	absorbanca (negativni logaritem prepustnosti)
A ₂₆₀	absorbanca (negativni logaritem prepustnosti) pri svetlobi valovne dolžine 260 nm
A ₂₈₀	absorbanca (negativni logaritem prepustnosti) pri svetlobi valovne dolžine 280 nm
Amp	antibiotik ampicilin
BSA	goveji serumski albumin (angl. »bovine serum albumin«)
CFU	kolonijska enota (angl. »colony forming unit«)
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid (angl. sinonim »cetrimonium bromide«)
dAMP	deoksiadenozin monofosfat
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCMP	deoksicitidin monofosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
DDT	dikloro difenil trikloroetan
dGMP	deoksigvanozin monofosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. »deoxyribonucleic acid«)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
dTMP	deoksitimidin monofosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. »ethylenediaminetetraacetic acid«)
FL	fluorescenza
Glc	glukoza (angl. »glucose«)
LB	lizogeno gojišče (angl. »lysogeny broth«)
Me	mediana
MQ	deionizirana in mikrofiltrirana voda Milli-Q®
N	vzorec
NK	nukleinska kislina
OD	optična gostota (angl. »optical density«)
OD600	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
OD654	optična gostota pri valovni dolžini 654 nm
PBS	fosfatni pufer z dodatkom NaCl-a (angl. »phosphate-buffered saline«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. »polymerase chain reaction«)
R	odpornost proti
rDNA	ribosomska DNA
RNA	ribonukleinska kislina (angl. »ribonucleic acid«)
rRNA	ribosomska RNA
s	trdno agregatno stanje (angl. »solidus«)

S	koeficient sedimentacije [svedberg]
SSC	stranski odgoj (angl. »side scatter«)
NaDS	natrijev dodecilsulfat (angl. »sodium dodecyl sulphate«)
Str	antibiotik streptomycin
T	tipski sev (»angl. type strain«)
TBE	tris-borat-EDTA
TE	tris-EDTA
T _m	temperatura tališča (angl. »melting temperature«)
U	enota (angl. »unit«)
ut. %	utežnostni odstotek [w/v]
UV	ultravijolična svetloba
vol. %	volumski odstotek [v/v] ali [v/v/v]

SLOVARČEK

genska knjižnica	Zbirka odsekov DNA, ki so lastni istim genom nekih organizmov. Odseke DNA nakjučno povežemo s plazmdnim vektorjem, rekombinantno DNA pa vnesemo v sprejemno celico. Knjižnica je pravzaprav zbirka gostiteljskih celic, od katerih vsaka vsebuje plazmid z vključkom.
operon	Funkcionalno področje DNA pri bakterijah. Vključuje več strukturnih genov, ki so hkrati regulirani. Strukturni geni določenega operona imajo informacije za sintezo proteinov, ki so vključeni v isto metabolno pot. Operon vsebuje še vezavno mesto za represor (to področje se imenuje operator), vezavno mesto za aktivator ter promotorsko regijo za vezavo RNA-polimeraze in ustreznih regulatornih molekul.
rekombinantna DNA	Sintezna molekula DNA, sestavljena iz odsekov DNA različnega izvora, ki se v takšni obliki naravno ne nahaja.
transgena celica	Celica z rekombinantno DNA.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Genomski lokus genov, ki kodirajo ribosomsko RNA, imenujemo *rrn*. Običajno operon *rrn* vključuje le en gen, ki kodira 16S, 23S in 5S rRNA, operon pa je v genomu lahko prisoten tudi v več kopijah.

Analize s kvantitativnimi molekularnimi metodami uporabljajo število genov, ki kodirajo 16S rRNA, bodisi v genskih knjižnicah bodisi kot količino njihovih pomnožkov pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo v realnem času, za ugotavljanje števila organizmov. Ker pa je število ribosomskih operonov na nivoju vrst raznoliko, so ocene števila bakterijskih vrst in s tem okoljske raznolikosti, na podlagi števila genov, ki kodirajo 16S rRNA, lahko napačne. Zato smo želimo ugotoviti, v kolikšni meri se število operonov *rrn* odraža v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilji raziskovanja so bili urediti *in silico* zbirkko kromosomov bakterijskih vrst iz debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka. Z bioinformacijsko analizo smo žeeli ugotoviti število genov, ki kodirajo 16S rRNA v objavljenih genomih bakterij. Zanimalo nas je ali se razporeditev srednje vrednosti števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo debelo črevo, razlikuje od analize vseh uporabnih genomov bakterij iz prebavnega trakta.

Izbira parov bakterijskih vrst za nadaljno eksperimentalno delo je temeljila na medsebojni razliki v številu operonov *rrn* in njihovi filogenetski sorodnosti. Naredili smo dve genski knjižnici iz ekvimolarnih mešanic kromosomske DNA dveh vrst (*Bacteroides vulgatus* DSM 1447 in *Prevotella ruminicola* Bryant 23, *B. vulgatus* DSM 1447 in *Ruminococcus albus* 7), v treh ponovitvah. Ugotavliali smo, ali se je razmerje operonov *rrn* izbranih bakterijskih vrst izkazovalo v deležu genov, ki kodirajo 16S rRNA v knjižnicah transgenih celic.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- (i) Bioinformacijska analiza števila operonov *rrn* bakterijskih vrst iz debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka, naj bi pokazala razlike že na nivoju vrst.
- (ii) Predvidevamo, da bodo deleži genov, ki kodirajo 16S rRNA, posameznih bakterijskih vrst v ponovitvah genskih knjižnic med seboj primerljivi.
- (iii) Razmerje števila operonov *rrn* naj se bi odražalo v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA, izbranih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MOLEKULARNO BIOLOŠKE METODE ZA ANALIZO MIKROBNE ZDRUŽBE

Pomankljivosti tradicionalnih mikrobioloških pristopov so v zadnjih desetletjih prejšnjega tisočletja zahtevale razvoj učinkovitih molekularnih metod, zasnovanih na analizi nukleinskih kislin (Wen-Hsiung in Graur, 1990). Z razčlenjevanjem informacije v semantičnih molekulah (Zuckerkandl in Pauling, 1965; Torsvik in sod., 1996) so nove tehnike omogočile: **(i)** odkrivanje in identifikacijo mikroorganizmov neposredno v okoljskih vzorcih, brez potrebe po izolaciji in gojenju v čistih kulturah (Lane in sod., 1985; Olsen in sod., 1986; Medlin in sod., 1988; Weisburg in sod., 1991), **(ii)** *in situ* proučevanje celokupne pestrosti in dinamike mikrobnih združb, **(iii)** ekofiziologijo filogenetsko sorodnih mikrobnih skupin in **(iv)** ugotavljanje filogenetskih odnosov med fiziološko samosvojimi mikrobimi skupinami. Uveljavitev molekularnih metod v mikrobeni ekologiji je ključno pripomoglo k celovitejšemu in širšemu vpogledu v pestrost in razširjenost mikroorganizmov v okolju, razumevanju njihove globalne premoči po raznolikosti in biomasi ter prepoznavanju funkcionalnega in genetskega potenciala (Torsvik in sod., 1996).

2.2 MOLEKULARNI KRONOMETER

Molekularni ali evolucijski kronometer je univerzalno prisotna in funkcionalno istovetna molekula. Molekulo uporabljam za proučevanje filogenetskih odnosov med organizmi, z namenom ugotavljanja naravnega taksonomskega sistema (naravne hierarhične klasifikacije, če obstaja) ali postavitev modelov, ki z večjo ali manjšo verodostojnostjo lette odsevajo. Zahteve, ki jih mora izpolnjevati molekularni kronometer, so navedene in razložene (Klemenčič, 2006) v Preglednici 1.

Preglednica 1: Zahteve, ki jih mora izpolnjevati molekularni kronometer (Eisen, 1995; Woese, 2000)

Zahteva	Razlaga
funkcionalna invariantnost	Molekula pri vseh proučevanih organizmih opravlja identično funkcijo, ki mora biti enaka prvobitni.
homolognost	Evolucijsko razdalijo med organizmi je smiselno meriti le, če izhajajo iz skupnega prednika.
množina v celici	Zadostna, da omogoča izolacijo.
odsotnost lateralnih prenosov	... predvsem medvrstnih
poravnava zaporedij	Potrebna za ugotavljanje podobnosti in razlik (insercije, delekcije, substitucije) v nukleotidnem ali aminokislinskem zaporedju.
sorazmernost spremenjanja zaporedij z evolucijsko razdalijo	Hitrost fiksacije mutacij v DNA mora biti sorazmerna evolucijski razdaliji, ki jo merimo.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 1: Zahteve, ki jih mora izpolnjevati molekularni kronometer (Eisen, 1995; Woese, 2000)

Zahteva	Razlaga
število dostopnih zaporedij	Relevantni zaključki so možni le, če medsebojno primerjamo zadostno število zaporedij (pomen prosto dostopnih podatkovnih baz na svetovnem spletu).
univerzalnost/ubikvitarnost	Prisotnost molekule pri vseh proučevanih organizmih.

Molekularni kronometer je gen, del gena ali produkt gena. Uporabljene so predvsem molekule, vključene v različne stopnje izražanja in prenosa genske informacije – koraki od gena do RNA ali proteina so ubikvitarni, dobro ohranjeni in biološko esencialni, hkrati pa med organizmi/taksoni izkazujejo dovoljšno variabilnost, da omogočajo izpeljave zaključkov o filogenetskih odnosih (grupiranje organizmov na podlagi podobnosti) (Klemenčič, 2006).

2.2.1 Gen, ki kodira 16S rRNA kot molekularni kronometer

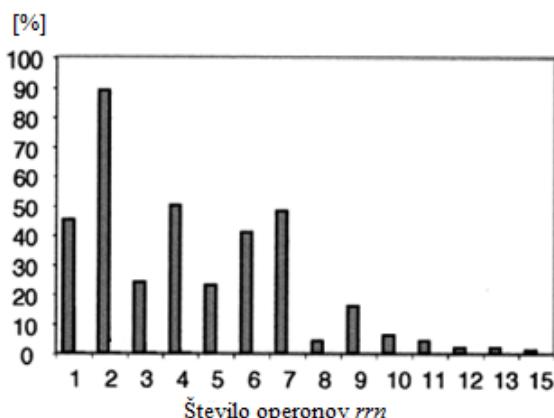
Z razvojem molekularno bioloških tehnik v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so Woese in sod. (1975) pokazali, da je del bakterijskega genoma, ki vsebuje zapis za rRNA (16S) manjše podenote ribosomov (angl. »small-subunit ribosomal RNA«), uporaben kot splošen filogenetski označevalec (Fox in sod., 1977). Gen, ki kodira 16S rRNA se pogosto rutinsko uporablja za ugotavljanje raznolikosti bakterij (Hugenholtz in sod., 1998), identifikacije in njihove filogenetske sorodnosti (Ludwig in Schleifer, 1994; Olsen in sod., 1994), za detekcijo in kvantifikacijo specifičnih populacij (Head in sod., 1998; Hugenholtz in sod., 1998) in je osnova za molekularno taksonomijo, sistematiko in evolucijo (Nübel in sod., 1996; Macrae, 2000, Acinas in sod., 2004).

Molekula 16S rRNA je ubikvitarna (Acinas in sod., 2004), sodeluje pri sintezi proteinov, ki je ohranjen proces (Jeffares in sod., 1998), njena funkcija pa je konstantna in enaka pri vseh do sedaj znanih organizmih. Dolžina molekule (\approx 1600 nukleotidov; Wittmann, 1975; Fox in sod., 1977) zadošča, da jo imamo za informativno in hkrati omogoča tehtno analizo razlik med poravnanimi zaporedij genov, ki kodirajo 16S rRNA. Po drugi strani pa je primerno kratka za njeno uspešno pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo. Vsebuje tako evolucijsko ohranjene regije, kot tudi področja visoke variabilnosti, kar omogoča *in silico* oblikovanje hibridizacijskih sond in začetnih oligonukleotidov z različnimi ravnimi taksonomske specifičnosti (Sogin in sod., 1972; Fox in Woese, 1975; Woese in sod., 1975, Fox in sod., 1977; Pace in sod., 1986; Woese, 1987; Head in sod., 1998; Acinas in sod., 2004). Molekula je v celici prisotna v velikem številu, zaradi česar jo je razmeroma lahko izolirati za proučevanje.

Primernost uporabe genov, ki kodirajo 16S rRNA za proučevanje mikroorganizmov v njihovih naravnih okoljih je zato vzrok in istočasno posledica hitrega kopičenja ribosomskih zaporedij v javno dostopnih podatkovnih zbirkah. Rastoče zbirke omogočajo analizo zaporedij in zagotavljajo kritične podatke za oceno mikrobne raznolikosti in evolucije (Amann in sod., 1995; Acinas in sod., 2004).

2.2.1.1 Število operonov *rrn* v genomu

V bakterijskih genomih najdemo od 1 do 15 ribosomskih operonov. Povprečno je v kromosomih 7 kopij, vendar ima približno 40 % proučevanih bakterij le 1 ali 2 operona *rrn* (Slika 1) (Fogel in sod., 1999; Acinas in sod., 2004).



Slika 1: Delež števila operonov *rrn* v genomih bakterijskih vrst (Acinas in sod., 2004: 2632)

Oznaka:

ⁱ Raziskava je temeljila na vseh do tedaj (september 2003) objavljenih popolnih zaporedij genomov taksonomske domene *Bacteria* ($N = 72$).

Število operonov *rrn*, njihova organizacija v genomu, dolžina genoma in število kromosomov se močno razlikuje med prokariotskimi vrstami. Dolžina genoma se razpenja od 0,6 Mb do 13 Mb (Cole in Girons, 1994). Število kromosomov v celici pa lahko variira (npr. *Brucella melitensis* ima dva kromosoma z dolžino 2100 kb in 1150 kb (Michaux in sod., 1993)). A statistična analiza, ki so jo opravili Fogel in sod. leta 1999, ne kaže korelacije med dolžino genoma in številom operonov *rrn*.

Proučevani sevi *E. coli*, podvrženi kontinuitetno spreminjajočemu okolju v prebavilih gostitelja in ekstremnemu stradanju v vodnih okoljih, dosegajo uravnoveženo rast le v krajsih časovnih periodah. Takšnemu okolju se je bakterija prilagodila z večjim številom ribosomskih operonov, ki kot primarni mehanizem vzdržuje optimalno ribosomsko produkcijo tokom hitre rasti. V splošnem se mikroorganizmi z več operoni *rrn* hitreje podvojujejo v primerjavi z mikrobi, ki v genomu nosijo le 1 ali 2 zapisa ribosomskih operonov (Condon in sod., 1995). Tudi število molekul RNA-polimeraze, ki se veže na operon *rrn*, je fizično omejeno, zato imajo vrste z manj operoni *rrn*, ob soočenju z nenadno povišano koncentracijo RNA-polimeraze, težave z zamikom hitrosti rasti. RNA-polimeraza sicer obvladuje takšno situacijo s povečano stopnjo iniciacije ter hitrejšo transkripcijo (Condon in sod., 1993; Vogel in Jensen, 1994). Vendar zaradi prehitre transkripcije so lahko prepisi rRNA nepravilni, kar vodi do oblikovanja nefunkcionalnih ribosomov. V situacijah, ki zahtevajo nenadno povečano stopnjo sinteze rRNA, ima *E. coli* s 7 operoni *rrn* torej prednostno adaptacijo (Condon in sod., 1995). Večje število operonov *rrn* pomeni dolgoročne koristi za organizem (sposobnost prilagajanja spremenljivim fiziološkim pogojem, ribosomi s specifično celično funkcijo – translacija specifičnih mRNA), zaradi česar bi lahko bili v okolju številčnejši (Condon in sod., 1992; 1995; Klappenbach in sod., 2000). Posledično bi lahko domnevali, da stabilna okolja naseljujejo bakterije z manjšim

številom ribosomskih operonov, kar vodi k manjši napaki ocene raznolikosti (Klappenbach in sod., 2000; Acinas in sod., 2004).

Klappenbach in sod. (2000) še navajajo, da pojav bakterij z enakim številom operonov *rrn* iz različnih filogenetskih linj poganja, konvergentna evolucija z adaptacijo na podobne selektivne pritiske. Še več, bakterije z večjim številom operonov *rrn*, ki so zmožne hitrega odziva na okoljske spremembe, so prav tiste, ki prevladujejo v izolatih tradicionalnih gojitvenih metod. A kot sta dokazala Crosby in Cridle (2003), tudi molekularne metode, ki uporabljajo 16S rDNA kot tarčo, precenijo kvantitativno vrednost istih organizmov.

Pojavljajo se tudi razlike v številu operonov *rrn* znotraj vrste (Preglednica 2). Le-te sicer niso pogoste, a pojav nikakor ni omejen na specifično filogenetsko skupino (Fogel in sod., 1999; Acinas in sod., 2004). Prav zaradi raznolikega števila ribosomskih operonov med taksoni je uporaba gena, ki kodira 16S rRNA kot filogenetskega označevalca omejujoča, saj lahko število mikroorganizmov v okoljskih vzorcih narobe ocenimo.

Preglednica 2: Različno število operonov *rrn* znotraj vrst (Fogel in sod., 1999; Acinas in sod., 2004)

Vrsta	Taksonomska enota	Število operonov <i>rrn</i>
<i>Rhodococcus fascians</i>	<i>Actinobacteria</i>	4 ali 5
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	alfa proteobakterija	1 ali 2
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	alfa proteobakterija	1 ali 2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydiae</i>	1 ali 2
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Firmicutes</i>	9 ali 10
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Firmicutes</i>	10 ali 11
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Firmicutes</i>	9 do 13
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Firmicutes</i>	9 ali 10
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Firmicutes</i>	5 ali 6
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Firmicutes</i>	5 ali 6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Firmicutes</i>	6 ali 7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Firmicutes</i>	5 ali 6
<i>Mycoplasma capricolum</i>	<i>Firmicutes</i>	1 ali 2
<i>Azomonas macrocytogenes</i>	gama proteobakterija	6 do 9
<i>Azotobacter chroococcum</i>	gama proteobakterija	6 do 9
<i>Azotobacter paspali</i>	gama proteobakterija	6 do 9
<i>Azotobacter vinelandii</i>	gama proteobakterija	6 do 9
<i>Vibrio cholerae</i>	gama proteobakterija	7 do 9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	gama proteobakterija	9 ali 11
<i>Yersinia pestis</i>	gama proteobakterija	6 ali 7
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Spirochaetes</i>	1 ali 2

2.2.1.2 Organizacija genov v operonu *rrn*

Ribosomski geni so v transkripciji enoti razvrščeni zaporedoma v smeri 5'-promotor1-promotor2-16S-vmesnik-23S-5S-tRNA-terminacijska regija-3' (Nomura in sod., 1984; Zaporozets in sod., 2003). A organizacija genov je lahko tudi drugačna. Pri *Thermus thermophilus* je gen, ki kodira 16S rRNA, ločen in se prepiše neodvisno od genov RNA

velike ribosomske podenote (Hartmann in Erdmann, 1989). Geni, ki kodirajo 5S rRNA so ločeni od genov, ki kodirajo 16S in 23S rRNA v genomu *Pirellula marina* (Liezack in Stackebrandt, 1989). Geni, ki kodirajo ribosomsko RNA pri *Leptospira interrogans* (Fukunaga in Mifuchi, 1989) in *Thermoplasma acidophilum* se vsi prepišejo ločeno (Ree in Zimmermann, 1990). Pri družini *Lachnospiraceae* pa je transkripcijska enota operona *rrn* urejena v smeri 5'-16S-5S-23S-3' (Kelly in sod., 2010).

2.2.1.3 Regulacija izražanja operonov *rrn*

Močni promotorji ribosomskih operonov predstavljajo več kot polovico transkripcijske dejavnosti celice tekom visoke stopnje rasti in so predmet zapletenega sklopa prekrivajočih se nadzornih mehanizmov (Condon in sod., 1992): protein Fis (Ross in sod., 1990), odziv na težavne razmere (angl. »stringent response«) (Ferullo in Lovett, 2008), σ^{32} (Straus in sod., 1987).

Različna regulacija transkripcije ribosomskih operonov tekom življenskega cikla in pogojev rasti morda omogoča selekcijo in funkcionalno prilagoditev posameznih operonov *rrn* (Nübel in sod., 1996). Dokazano je, da delecija enega izmed 7 operonov *rrn* *E. coli* ali enega od 10 operonov *rrn* *Bacillus subtilis* nima opaznih vplivov na hitrost rasti ali fiziologijo, kar pomeni, da organizem ne potrebuje izraženega popolnega kompleta operonov *rrn* (Ellwood in Nomura, 1980; Loughney in sod., 1983; Widom in sod., 1988; Condon in sod., 1992). Leta 1992 so Condon in sod. ob proučevanju ribosomskih operonov *E. coli* ugotovili, da 7 operonov *rrn* ni niti izraženih niti reguliranih enako, temveč je izražanje posameznih operonov *rrn* razmeroma individualno glede na mesto v kromosому in fiziološke pogoje. Z rezultati omenjene študije so tako eksperimentalno ovrgli splošno domnevo, da se ribosomski operoni, med optimalno rastjo, izražajo enakovredno.

V hitro rastočih celicah je čas, potreben za podvojitev celotnega kromosoma, daljši od časa celične delitve, zato se za premostitev očitnega paradoksa v celicah začne nov krog podvojevanja, preden predhodne replikacijske vilice dosežejo terminacijsko regijo (Ter). Posledično najdemo bližje mestu začetka podvojevanja kromosoma (angl. »origin of replication«) zgoščeno več ribosomskih operonov kot proti zaključevalnemu zaporedju (Condon in sod., 1995). Po teoretičnih izračunih, ki jih potrjujejo tudi eksperimentalni podatki, naj bi pričakovali kar 2-krat večjo ekspresijo operonov *rrn*, ki so bližje mestu začetka podvojevanja.

Condon in sod. (1992) v študiji navajajo tudi, da nobeden od 7 operonov *rrn* *E. coli* ni esencialen med logaritemsko fazo rasti niti za rast na minimalnem ($M9_{Glc}$) ali kompleksnem gojitvenem mediju (LB_{Glc}). Na minimalnem gojišču je bila opažena le četrtnina obsega enakovrednega izražanja operonov *rrn* na kompleksnem gojišču, saj ima *E. coli* namreč manj replikacijskih vilic med počasno rastjo. Leta 1995 objavijo tudi, da je le 5 od 7 operonov *rrn* *E. coli* pravzaprav potrebnih za optimalno rast v kompleksnem rastnem mediju. Vsi operoni *rrn* *E. coli* se izražajo pod stresnimi pogoji (aminokislinsko stradanje bakterijskih celic, odgovor na vročinski šok (angl. »heat-shock response«), mutacija gena *fis*), vendar ne števno enakovredno pri posameznemu stresu. Čeprav je manj verjetno, da obstajajo funkcije, ki so individualno usmerjene k le enemu operonu *rrn*, bi lahko le-te

odražale selektivno prednost v sposobnosti prilagajanja na spremenjajoče se rastne pogoje (Condon in sod., 1992).

Isti raziskovalci so leto za tem objavili, da v nekaterih sevih najdemo tudi tihe operone *rrn*, zaradi česar se izražanje preostalih kopij znatno poveča za kompenzacijo primanjkljaja. To nakazuje, da 7 ribosomskih operonov *E. coli* morda ne deluje enakovredno po največji zmogljivosti. Do podobnih dognanj so prišli tudi Reiney in sod. (1996), ki v objavljeni študiji navajajo, da se kljub 15 kopijam gena, ki kodira 16S rRNA v genomu *Clostridium paradoxum*, prepisujeta le dva, ostali so tihi geni. Ti se ne izražajo niti pod vplivi ekstremnih okoljskih pogojev (ekstremna temperatura, vrednost pH, koncentracija NaCl, starost kulture).

Farrelly in sod. (1995) v študiji razlagajo, da je delež genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnožen v verižni reakciji s polimerazo iz ekvimolarne količine DNA dveh bakterijskih vrst, odvisen od števila operonov *rrn*. V poskusu so merili jakost obarvanih (barvilo SYBR-Green I) pomnožkov gena, ki kodira 16S rRNA. Eksperimentalno razmerje pomnožene tarčne DNA, iz parov vrst *E. coli* (7 operonov *rrn*) in *Thermus thermophilus* (2 operona *rrn*) ter *Pseudomonas aeruginosa* (4 operoni *rrn*) in *T. thermophilus*, je ustrezano *in silico* vrednostim. Razmerje pomnožkov para *Bacillus subtilis* (10 operonov *rrn*) in *T. thermophilus* pa je kazalo nerazložljivo odstopanje v prid genov *B. subtilis*. Domnevajo, da je bilo pomnoževanje tarčne DNA *T. thermophilus* v verižni reakciji s polimerazo podvrženo neznanemu vplivu genoma *B. subtilis*. Možni dejavniki bi lahko bili: (i) od treh parov vrst s *T. thermophilus* ima *B. subtilis* nekoliko manjši genom, a največje število operonov *rrn*; (ii) v nasprotju z *E. coli* (Condon in sod., 1995) in *P. aeruginosa* (Römling in sod., 1989), kjer so operoni *rrn* enakomerno razporejeni v genomu, je 7 operonov *rrn* *B. subtilis* tesno nanizanih zaporedoma (Rudner in sod., 1993). Zato menijo, da bi morda zgoščena razporeditev operonov *rrn* v genomu lahko povečala učinkovitost pomnoževanja tarčne DNA, s čimer odraz razmerja števila genov, ki kodirajo 16S rRNA ne bi bil realno prikazan in bi opravičeval dobljeni rezultat. V objavljeni študiji so tako jasno dokazali, da kljub vedenju o velikosti genoma in številu operonov *rrn*, vedno ne moremo napovedati eksperimentalnega razmerja med številom genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA posameznih bakterijskih vrst.

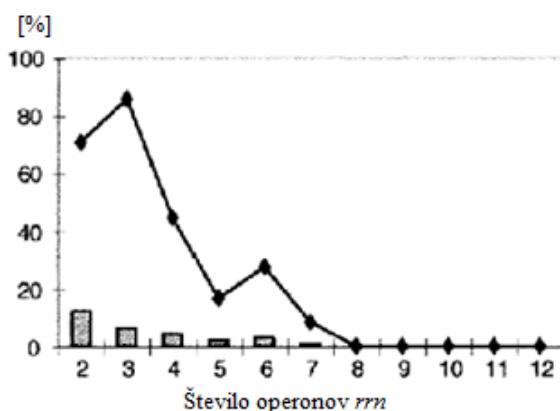
2.2.1.4 Heterogenost med operoni *rrn* v genomu

Dolgo so predpostavljali, da med kopijami genov, ki kodirajo ribosomske RNA obstajajo le manjše heterogenosti. Domneve so temeljile na skoraj identičnih restriktijskih kartah genov, ki kodirajo 16S in 23S rRNA sedmih ribosomskih operonov *E. coli* (Boros in sod., 1979) in velikega števila proteinov, ki so soodvisni od terciarne strukture rRNA, katera omogoča pravilno sestavo v ribosome.

Tekom let so bile opravljene številne študije, v katerih so primerjali kopije genov RNA male ali velike ribosomske podenote v genomu proučevanega organizma (Mylvaganam in Dennis, 1992; Wang in sod., 1997; Yap in sod., 1999; Tuorova in sod., 2001). V večini primerov so bila zaporedja, kot je bilo pričakovano, bodisi identična (npr. *Rhodobacter sphaeroides* (Dryden in Kaplan, 1990), *Haemophilus influenzae* Rd (Fleischmann in sod., 1995)) bodisi so se le malo razlikovala (npr. *E. coli* (Branlant in sod., 1981), *Tetrahymena*

pyriyormis (Heinonen in sod., 1990)) v manj kot 1 % primerjanih nukleotidnih mestih (Acinas in sod., 2004). Kljub temu najdemo mnoge izjeme. Pri halofilni arheji *Haloarcula marismortui* so odkrili 5 % razlike med geni, ki kodirajo 16S rRNA (Mylvanaganam in Dennis, 1992; Amann in sod., 2000). Pri evkariontskem parazitu *Plasmodium berghei* so opazili 3,5 % razlike (Gunderson in sod., 1987) in kar 17 % pri *P. falciparum* (McCutchan in sod. 1988) – njun genom vsebuje zapisa RNA dveh malih ribosomskih podenot (18S), ki se izražata v različnih stopnjah življenjskega ciklusa zajedavca. Tudi poravnava zaporedij dveh operonov *rrn* vrst *Thermobispora bispora* in *Thermomonospora chromogena* odkrije manj kot 94 % podobnosti (Wang in sod., 1997; Yap in sod., 1999). Še več, Acinas-ova in sod. (2004) navajajo, da se ekstremne razlike med operoni *rrn* praviloma pojavljajo med termofilnimi bakterijami (*Thermoanaerobacter tengcongensis* (11,6 %) (Acinas in sod., 2004), *Desulfotomaculum kuznetsovii* (8,3 %) (Tuorova in sod., 2001)), kar kaže na višjo pojavnost horizontalnih genskih prenosov v tej okoljski skupini (Acinas in sod., 2004). Pri tem pa velja še opomniti na Stackebrandt-ovo in Goebel-ovo (1994) »zastarelo« načelo, da naj bi zaporedji, ki se razlikujeta v 2,5 %, v splošnem pripadali različnim vrstam.

Heterogenost med ribosomskimi operoni v genomu (Slika 2) tako predstavlja znatno težavo za gojitveno neodvisne analize mikrobnih združb, ki temeljijo na 16S rDNA pristopih, saj lahko površna interpretacija rezultatov vodi v napačno ocenjeno mikrobeno raznovrstnost in proučevane filogenetske odnose (Crosby in Criddle, 2003). Acinas-ova in sod. (2004) so v *in silico* študiji, ki je zajemala 76 bakterijskih genomov s skupno 221 zaporedji genov, ki kodirajo 16S rRNA, dokazali, da bi na podlagi rezultatov izdelanih genskih knjižnic in določanja zaporedja gena, ki kodira 16S rRNA, kar 2,5-krat previsoko ocenili raznolikost. Mikroheterogenost, kot bi lahko opisali ta pojav, torej signifikantno spremeni sestavo genskih knjižnic (Field in sod., 1997; Casamayor in sod., 2002; Klepac-Ceraj in sod., 2004), kljub temu pa avtorji številnih raziskav zanemarjajo manjše razlike med zaporedji genov, ki kodirajo 16S rRNA ob oceni okoljske raznovrstnosti (Hughes in sod., 2001; Curtis in sod., 2002; Torsvik in sod., 2002). Čeprav je mikroheterogenost med geni, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA pogost pojav, ostaja še nejasno, ali je tudi makroheterogenost širše razširjena v naravi (Amann in sod., 2000). Potemtakem bi namreč filogenetske relacije med bakterijami lahko postale znatno zabrisane.



Slika 2: Število operonov *rrn* (stolci) v genomih bakterijskih vrst in delež genomov (linea), ki imajo vse kopije gena, ki kodira 16S rRNA identične (Acinas in sod., 2004: 2633)
Oznaka:

ⁱ Raziskava je temeljila na vseh do tedaj (september 2003) objavljenimi popolnimi zaporedji genomov taksonomske domene *Bacteria* (N = 72).

V raziskavah mikrobne ekologije so v verižni reakciji s polimerazo pomnoženi geni, ki kodirajo 16S rRNA pogosto izbrani glede na njihovo dolžino, v izogib nespecifičnim pomnoženim produktom. A ker imajo (sicer redki) mikroorganizmi nekatere gene, ki kodirajo rRNA daljše – npr. dodano vmesno zaporedje (angl. »intervening sequence«) v le 2 od 15 genov, ki kodirajo 16S rRNA *Clostridium paradoxum* (Reiney in sod., 1996)), lahko le-te zmotno zamenjamo za nespecifične produkte in jih načrtno odstranimo iz nadaljnje analize. S tem izgubimo vedenje o heterogenosti znotraj seva in posledično o obči mikrobnih raznolikosti. Še več, morda bi bilo potrebno upoštevati, da skupina visoko sorodnih osamljenih okoljskih zaporedij 16S rDNA, naj ne bi predstavljala filogenetsko ločene seve, temveč heterogena zaporedja gena, ki kodirajo 16S rRNA enega seva (Rainey in sod., 1996).

Pri vrstah z več kot enim ribosomskim operonom tako morda med organizmi ne primerjamo ortologih, temveč paralogene gene (Eisen, 1995). Nübel in sod. (1996) v študiji predpostavlja, da genska konverzija in/ali selekcija v operonih *rrn* delujeta na različne načine ali z neenako frekvenco v različnih vrstah. Medvrstnim lateralnim prenosom genov (Nübel in sod., 1996) so podvrženi (Mylvaganam in Dennis, 1992; Wang in sod., 1997; Yap in sod., 1999; Tuorova in sod., 2001) tudi geni, ki kodirajo 16S rRNA in četudi ne, pa so jim podvrženi številni drugi filogenetski označevalci (Eisen, 1995) – molekularni kronometri so tudi: EF-TU (Ludwig in sod., 1994; Delwiche in sod., 1995), Hsp70, GroEL (Viale in sod., 1994), β-podenota ATP-aze (Ludwig in sod., 1994), RNA-polimerza (Klenk in Zilling, 1994), gen, ki kodira 23S rRNA (Ludwig in sod., 1992), RecA (Eisen, 1995).

Horizontalni genski prenosи in mutacije so primarno vpletene kot potencialni prispevek k heterogenosti bakterijskih ribosomskih operonov (Mylvaganam in Dennis, 1992; Acinas in sod., 2004), zatorej evolucija posameznega gena, ki kodira 16S rRNA ne odraža nujno evolucije vrste (Eisen, 1995). Kljub temu se heterogene regije v operonih *rrn* praviloma nahajajo na nepomembnih mestih, kjer kritično ne spreminjajo strukture rRNA ali njene funkcije (Mylvaganam in Dennis, 1992; Rainey in sod., 1996; Acinas in sod., 2004). Pomen heterogenosti je danes že nezan, vendar je možno, da bi lahko povzročala razlike v regulaciji izražanja genov, ki kodirajo rRNA (Condon in sod., 1992). Na podlagi heterogenosti tesno sorodnih zaporedij 16S rDNA pa bi lahko sklepali o funkcionalnih razlikah, fizioloških lastnostih (Fox in sod., 1992; Sass in sod., 1998; Prüß in sod., 1999; Torsvik in sod., 2002) in arhitekturi genoma izolatov.

2.3 MIKROBNA ZDRUŽBA V PREBAVNEM TRAKTU SESALCEV

Prebavni trakt sesalcev je kompleksen sistem, poseljen s 10^{13} do 10^{14} mikrobnimi celicami (Gill in sod., 2006). Večina mikrobiote pri monogastričnih živalih naseljuje zadnji del trakta, ki je opredeljen kot najgosteje poseljen naravni bakterijski ekosistem (Marchesi in Shanahan, 2007; Frank in Pace, 2008).

Kvantifikacija mikrobne raznolikosti prebavne vsebine ostaja kritično ekološko vprašanje že več kot 30 let. V zadnjem desetletju pa se je z uveljavitvijo in znižanjem stroškov molekularnih metod proučevanje mikrobiote izjemno povečalo. Večina molekularnih študij temelji na obsežnem odkrivanju in/ali nabiranju nukleotidnih zaporedij genov, ki kodirajo 16S rRNA. Po letu 2003 se je z razvojem metod hitrega in masovnega določevanja nukleotidnih zaporedji (Leamon in sod. 2003; Marguiles in sod., 2005) nabiranje novih zaporedij prebavne mikrobiote še pospešilo ter omogočilo razmah študij primerjalne genomike (Jerman in Avguštin, 2010). Prvo obsežno raziskavo proučevanja črevesne biote človeka so leta 2005 vodili člani raziskovalnih ustanov Relman lab in Inštituta za genomske raziskave (angl. »The Institute for Genomic Research«), v prizadovanju, da bi odkrili raznolikost znotraj mikrobiote (Eckburg in sod., 2005). Morda najpomembnejši napredek ponuja ustanovitev »Human Gut Microbiome Initiative« in kasnejši projekt »Human Microbiome Project«; interdisciplinarni obče obsegajoč namen v korist razumevanja mikrobnega genetskega in metabolnega potenciala, fiziologije in predispozicij bolezni (Turnbaugh in sod., 2007; Sleator in sod., 2008). Cilj te pobude je bil opisan kot konceptualna in eksperimentalna razširitev podobnih projektov. Z njimi bi razprli širši vpogled v človeško biologijo, vključujuč nove biooznačevalce, ki bi definirali stanje našega zdravja, prehrambene zahteve, razvoj oralnih zdravil ter nove načine napovedovanja individualnih in družbenih nagnjenosti do motenj, kot so infekcije s patogeni, debelost ter napačna odzivnost gostiteljevega imunskega odziva v črevesju (Gill in sod., 2006).

Prebavna mikrobiota je prepoznana kot pomemben dejavnik pri razgradnji hrane, povečevanju dostopnosti hranil, vira energije ter pri sintezi vitaminov (Jerman in Avguštin, 2010). Raziskave odkrivajo tudi mutualistične odnose črevesne mikrobiote z vplivom na aktivacijo imunskega sistema gostitelja (Mazmanian in sod., 2005), regulacijo metabolizma (Turnbaugh in sod., 2007), obnovo celic epitela (Rakoff-Nahoum in sod., 2004), energetske bilance in (Bäckhed in sod., 2004) biotransformacije (Nicholson in sod., 2005). Primerjave raznolikosti mikrobne združbe na podlagi ocene števila genov, ki kodirajo 16S rRNA razkrivajo pomembne razlike v združbi zdravih odraslih ljudi (Eckburg in sod., 2005; Ley in sod., 2005), kar lahko pomeni predispozicijo za določene bolezni (Crohn-ova bolezen, alergije, debelost, rak) (Gill in sod., 2006; Manichanh in sod., 2006; Kurokawa in sod., 2007).

Mikrobna pestrost v prebavilih sesalcev je relativno majhna. Prevladujoči bakterijski debli, pokrivajoč več kot 90 % vseh bakterijskih filotipov, sta *Firmicutes* (60 – 80 %) in *Bacteroidetes* (20 – 40 %) (Ley in sod., 2005; Eckburg in sod., 2005). Le manjši delež vrst iz debel *Actinobacteria*, *Proteobacteria* in *Verrucomicrobia* sooblikuje komenzalno mikrobioto (Eckburg in sod., 2005; Tap in sod. 2009). Pestrost mikrobne združbe se kaže predvsem na nižjih taksonomskih nivojih, kar naj bi bila posledica gostiteljske selekcije in koevolucije v relativno stabilni ekološki niši (Dethlefsen in sod., 2007). V populaciji se mikrobiota praviloma razlikuje, a v okviru posameznika tekom časa ostaja dokaj konstantna z možnimi potencialnimi spremembami zaradi vpliva življenjskega sloga, prehranjevanja in staranja (Guarner in Malagelada, 2003; O'Hara in Shanahan, 2006). Ocenjeno število bakterijskih »molekularnih« vrst v debelem črevesu odraslega človeka je okrog 1000. V letu 2009 pa so znanstveniki iz Francoskega nacionalnega inštituta za agronomiske raziskave (fr. »Institut national de la recherche agronomique«) dokazali obstoj

66 ubikvitarnih vrst, ki sestavljajo jedro mikrobioma (iz rodov *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Bacteroides*, *Alistipes* in *Bifidobacterium*) (Tap in sod., 2009).

Predstavniki debla *Bacteroidetes* v prebavilih sesalcev fermentirajo ogljikove hidrate, porabljajo dušikove spojine ter so udeleženi v biotransformaciji žolčnih kislin. S pomočjo bakteroidet in njihovih encimov se v debelmu črevesu ponovno dekonjugira tudi do 95 % konjugiranih žolčnih kislin, ki se lahko nato kot take vrnejo v telo. Večina bakteroidet je »zmerno« saharolitičnih, razgrajujejo tudi kompleksne rastlinske polisaharide, kot so ksilan, pektin in celuloza, in imajo za to veliko število genov, ki kodirajo različne glikozilaze. Poleg bakteroidet v zadnjem delu prebavnega trakta – debelmu črevesu prevladujejo firmikuti iz razreda klostridijev, katerih je bistveno več kot laktobacilov in jih pripisujemo pomembnejšo vlogo pri fermentaciji polisaharidov (Jerman in Avguštin, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema, pripomočki, steklovina in potrošni material

3.1.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljen laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Model opreme, proizvajalec in država porekla
centrifuge	2K15, Sigma Laborzentrifugen, Nemčija; Mikro 200R, Hettich Centrifuge, Velika Britanija; Mini Spin Plus, Eppendorf, Nemčija; RC5C Sorvall® instruments, Nemčija
ciklična sistema	GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems, ZDA; MyCycler™, thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, ZDA
inkubator	I – 50, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
inkubatorski stresalnik	Unitron Plus, isis, Irska
magnetni mešali	RH basic 2, IKAMAG®, Nemčija; Yellow line MSH basic, IKA, Nemčija
mikroskop	BX50 F3, Olympus, Japonska
napajalnika za elektroforezo	EPS 600, Pharmacia Biotech, Švedska; PowerPac, BioRad, ZDA
pH elektroda	Ross® pH-Electrode 8162 Plus, Orion, ZDA
pH meter	520A, Orion, ZDA
pretočni citometer	FacScan, Becton Dickinson, ZDA
spektofotometri	GeneQuant™ 1300, GE Healtcare, Velika Britanija; Novaspec® II, Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija; UV-160A, Shimadzu Corporation, Japonska
termoblok	CH-100, Biosan Laboratories, Latvija
vibracijski mešalnik	PV-1, Grand-bio, Velika Britanija
vodni kopeli	Fabrika medicinskih uređaja Sutjeska, Srbija; WB-30, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija

3.1.1.2 Laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material

Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material

Proizvajalec in država porekla	Laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material
Bellco Glass Inc., ZDA	Hungate-ove epruvete
Bio-Rad Laboratories, ZDA	elekroforezni banjici: MiniSub® Cell GT; Wide Mini Sub® Cell GT
Cellstar®, ZDA	sterilne mikrotitrskie plošče
Finnpipette Digital, Finska	multikanalna polavtomatska pipeta: 40 – 200 µl
Finnpipette, ZDA	polavtomatske pipete: 0,3 – 3 µl; 1 – 10 µl; 1 – 5 ml; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl
Hausser Scientific, ZDA	Petroff-Hausser-jeva števna komora
Hellma GmbH & Co.KG, Nemčija	kvarčni kivet: 0,5 ml; 2,5 ml
Bellco Glass Inc., ZDA	Hungate-ove epruvete

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material

Proizvajalec in država porekla	Laboratorijski pripomočki, steklovina in potrošni material
Bio-Rad Laboratories, ZDA	elektroforezni banjici: MiniSub® Cell GT; Wide Mini Sub® Cell GT
Cellstar®, ZDA	sterilne mikrotitrskie plošče
Finnpipette Digital, Finska	multikanalna polavtomatska pipeta: 40 – 200 µl
Finnpipette, ZDA	polavtomatske pipete: 0,3 – 3 µl; 1 – 10 µl; 1 – 5 ml; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl
Hausser Scientific, ZDA	Petroff-Hausser-jeva števna komora
Hellma GmbH & Co.KG, Nemčija	kvarčni kivet: 0,5 ml; 2,5 ml
Millipore™, Irska	filtrirni filter: MILLEX®GS Filter Unit 0.22 µm, MF-Millipore MCE Membrane
Plastibrand®, Nemčija	mikrocentrifugirke: 0,2 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; sterilni trakti dvanajstih 0,2 ml mikrocentrifugirk s snemljivimi pokrovčki
Polysciences Inc., ZDA	fluorescentne lateksne kroglice: Fluoresbrite PolyFluor 1 micron beads

3.1.2 Kemikalije, raztopine, barvili, antibiotika, encimi in komercialno dostopni kompleti

Preglednica 5: Uporabljeni kemikaliji, raztopini, antibiotiki in barvili

Proizvajalec in država porekla	Kemikalija
Biolife, Italija	agar bacteriological, kvasni izvleček, tripton
Calbiochem®, ZDA	D-(+)-celobioza
Invitrogen Molecular Probes, ZDA	fluorescentno barvilo: SYTO® 13, »Green Fluorescent nucleic acid strain«
Kemika, Hrvaška	D-(+)-glukoza, imerzno olje, kalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4), natrijev citrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)
Merck KgaA, Nemčija	amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO_4$), borova kislina (H_3BO_3), dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), EDTA, kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), kloroform (1,1,1-triklorometan), magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$), natrijev bikarbonat ($NaHCO_3$), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \times H_2O$), natrijev klorid ($NaCl$), NaDS, izopropanol (2-propanol), tehnični etanol (96-vol. %), tris (tris(hidroksimetil)-aminometan)
Milipore™, ZDA	deionizirana in mikrofiltrirana voda Milli-Q®
SeaKem® LE Agarose, agariza	
Cambrex Bio Science, Rockland, Inc., ZDA	
Serva, Nemčija	bromfenolmodro ($C_{19}H_9Br_4O_5S \times Na$)
Biolife, Italija	agar bacteriological, kvasni izvleček, tripton
Calbiochem®, ZDA	D-(+)-celobioza
Invitrogen Molecular Probes, ZDA	fluorescentno barvilo: SYTO® 13, »Green Fluorescent nucleic acid strain«
Kemika, Hrvaška	D-(+)-glukoza, imerzno olje, kalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4), natrijev citrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 5: Uporabljene kemikalije, raztopine, antibiotika in barvili

Proizvajalec in država porekla	Kemikalija
Merck KgaA, Nemčija	amonijev sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄), borova kislina (H ₃ BO ₃), dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O), EDTA, kalijev dihidrogen fosfat (KH ₂ PO ₄), kloroform (1,1,1-triklormetan), magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO ₄ × 7H ₂ O), natrijev bikarbonat (NaHCO ₃), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O), natrijev klorid (NaCl), NaDS, izopropanol (2-propanol), tehnični etanol (96-vol. %), tris (tris(hidroksimetil)-aminometan) deionizirana in mikrofiltrirana voda Milli-Q® agaroza
Milipore™, ZDA SeaKem® LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, Inc., ZDA Serva, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA	bromfenolmodro (C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ S × Na) CTAB, voda brez nukleaz, fenol/kloroform/izoamilalkohol (25:24:1; vol. %), glicerol (≥ 99 vol. %), L-cistein HCl, topni škrob, fenol (hidroksibenzol)
Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA	ampicilin, mešanica dNTP-jev, MgCl ₂ , raztopina fragmentov znanih velikosti – 1-kb lestvica (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder), streptomycin, voda brez nukleaz

Preglednica 6: Uporabljeni encimi in pufri

Proizvajalec in država porekla	Encim	Pufer
Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA	<i>AvaII</i> , T4 DNA ligaza, <i>Taq</i> DNA polimeraza, DNA »blunting« encim, <i>TaqI</i>	R ⁺ z BSA, reakcijski pufer reakcije »blunting«, <i>Taq</i> s KCl
NEW ENGLAND BioLabs, Velika Britanija		NEBuffer4

Preglednica 7: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti

Proizvajalec in država porekla	Komercialno dostopen komplet
Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA	»CloneJET™ PCR Cloning Kit« (#K1232)
Roche Applied Science, Nemčija	»High Pure PCR Product Purification Kit« (#11732668001), »High Pure Plasmid Isolation Kit« (#11754785001)

3.1.3 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine

Ves material za gojenje bakterij in pufre smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih. Temperaturno občutljive snovi tako, da smo jih prefiltrirali skozi filter MILLEX®GS (Millipore) s premerom por 0,22 µm, vse ostalo pa z 20-minutno sterilizacijo v avtoklavu z vlažno toploto pri 121 °C in tlaku 1,2 × 10⁵ Pa.

3.1.4 Večkomponentne raztopine in pufri

Preglednica 8: Sestavine večkomponentnih sestavin in pufrov, ki smo jih uporabljali pri delu

Pufer/večkomponentna raztopina	Sestavine	Opombe pri pripravi
5-kratni pufer TBE	0,45 M borova kislina, 0,5 M EDTA (pH 8,0), 0,45 M tris	
nanašalni pufrer tipa IV	0,25 vol. % barvilo bromfenolmodro v 40 ut. % vodni raztopini saharoze	
pufer PBS	7 mM Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 130 mM NaCl, 3 mM NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	Soli smo raztopili v vodi MQ. Pufer smo umerli do vrednosti pH 7,4 ter ga prefiltrirali v steklenico, ki je bila tekom avtoklaviranja napolnjena z vodo MQ.
pufer TE	0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 M tris-HCl (pH 8,0)	Pufer smo umerli do vrednosti pH 8,0.
raztopina CaCl ₂	0,1 M CaCl ₂ × 2H ₂ O	Sol smo raztopili v vodi MQ.
raztopina EDTA	0,5 M EDTA	Kemikalijo smo raztopili v vodi MQ. Z NaOH _(s) smo popravili vrednost pH, saj se EDTA ne raztopi, dokler vrednost pH ni približno 8.
raztopina NaCl	5 M NaCl	Sol smo raztopili v vodi MQ.
raztopina proteinaze K	20 mg/ml	Kemikalijo smo raztopili v vodi MQ.
raztopina RNaze A	10 mg/ml RNaze A	Raztopino smo inkubirali 15 minut pri 100 °C in jo nato raztopimo v 10 mM trisCl ohladili do sobne temperature. Za uporabo smo jo naknadno (pH 7,5) in 15 mM NaCl redčili s pufrom TE do končne koncentracije 50 µg/ml.
raztopina tris-HCl	1 M tris-HCl	Raztopino smo umerli do vrednosti pH 8,0.
založna raztopina antibiotika	100 mg/ml	Antibiotik smo raztopili v vodi MQ.

3.1.5 Gojišča in mediji za rast bakterijskih celic

3.1.5.1 Gojišče LB

Uporabljali smo tekoča in trdna gojišča LB, ki so specifično prilagojena gojenju bakterije *E. coli* (Bertani, 1951). Pri pripravi kompetentnih celic smo potrebovali tekoče gojišče LB z antibiotikom streptomycinom (v končni koncentraciji 100 µg/ml). Za izdelavo knjižnic transgenih celic pa smo uporabljali tekoča in trdna gojišča LB z dodanim antibiotikom ampicilinom (v končni koncentraciji 100 µg/ml).

3.1.5.1.1 Tekoče in trdno gojišče LB

Za pripravo tekočega gojišča LB (Bertani, 1951) smo v primerni steklovini popolnoma raztopili tripton, kvasni izvleček in NaCl (Preglednica 9) v destilirani vodi. Ohlajenemu steriliziranemu gojišču smo po potrebi dodali antibiotik ter ga do uporabe hranili pri 4 °C.

Preglednica 9: Sestavine za pripravo gojišča LB

Sestavina	Koncentracija [ut. %]
kvasni izvleček	0,5
NaCl	1
tripton	1

Trdnim gojiščem LB smo dodali še 1,5 ut. % agarja. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili do 55 °C, mu po potrebi dodali antibiotik, rahlo premešali ter ga v laminariju razlili od 15 do 25 ml v sterilne plastične petrijevke. Plošče z gojiščem smo osušili v laminariju ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.5.1.2 Tekoči pufer LB za zamrzovanje sevov

Za pripravo tekočega pufra LB za zamrzovanje sevov (angl. »LB freezing buffer«; Zimmer in Verrinder Gibbins, 1997) smo v primerni steklovini postopoma raztopili soli v 100 ml gojišča LB (Preglednica 10). Izmerili in uravnali smo vrednost pH na 7,5. Zavrgli smo 4,4 ml odpipetirane raztopine, jo nadomestili z enakim volumnom glicerola in dobro premešali. Ohlajenemu steriliziranemu pufru smo dodali antibiotik ampicilin (v končni koncentraciji 100 µg/ml) ter ga do uporabe hranili pri 4 °C.

Preglednica 10: Sestavine za pripravo pufra LB za zamrzovaje sevov

Sestavina	Koncentracija [ut. %]
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ × 7H ₂ O	0,05
K ₂ HPO ₄	0,63
KH ₂ PO ₄	0,18
kvasni izvleček	0,5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1
NaCl	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,09
tripton	1
glicerol	4,4 vol. %

3.1.5.2 Modificirano gojišče M2

Za pripravo tekočega modificiranega semidefiniranega anaerobnega gojišča M2 (Hobson, 1969) za vampne bakterije smo v primerni steklovini raztopili tripton, kvasni izvleček, glukozo, celobiozo, topni škrob in NaHCO₃ v mineralni raztopini I, mineralni raztopini II, vampnem soku, raztopini rezasurina (Preglednica 11) ter destilirani vodi. Zaradi izparevanja vode tekom vrenja smo prilili destilirano vodo v količini 10 % volumna gojišča. Gojišče smo prevreli, ohladili ter 5 do 10 minut prepihavali s CO₂ brez primesi kisika. Dodali smo L-cistein HCl, premešali in prepihavali še 5 minut preden smo anaerobno alikvotirali po 10 ml gojišča v steklene Hugate-ove epruvete (Bellco Glass Inc., ZDA). Sterilizirano gojišče smo do uporabe hranili pri sobni temperaturi. Poltrdnim gojiščem M2, ki smo jih uporabili za shranjevanje bakterijskih sevov, pa smo dodali še 0,7 ut. % agarja.

Preglednica 11: Sestavine za pripravo modificiranega gojišča M2

Sestavine	Koncentracija
celobioza	0,2 ut. %
glukoza	0,2 ut. %
kvasni izvleček	0,25 ut. %
L-cistein HCl	0,1 ut. %
NaHCO ₃	0,4 ut. %
celobioza	0,2 ut. %
glukoza	0,2 ut. %
kvasni izvleček	0,25 ut. %
L-cistein HCl	0,1 ut. %
NaHCO ₃	0,4 ut. %
rezasurin	0,001 ut. %
topni škrob	0,2 ut. %
tripton	1,0 ut. %
destilirana voda	40,0 vol. %
mineralna raztopina I	15,0 vol. %
mineralna raztopina II	15,0 vol. %
vampni sok ^a	30,0 vol. %
<hr/>	
Mineralna raztopina I	g/1000 ml dH₂O
K ₂ HPO ₄	3,0
<hr/>	
Mineralna raztopina II	g/1000 ml dH₂O
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,6
KH ₂ PO ₄	3
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,7
NaCl	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6

Oznaka:

^a Vampni sok so po odvzemu precedili in centrifugirali (centrifuga RC5C Sorvall® instruments, Nemčija) 30 minut pri 15 °C in 10000 vrtljajih/minuto. Avtoklaviran supernatant vampnega soka smo do uporabe hranili pri 4 °C (Ferme, 2008).

3.1.6 Bakterijski sevi

Uporabljeni bakterijski sevi so nepatogeni, zato jih po Direktivi Evropskega parlamenta in Sveta o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu (Direktiva ..., 2000) uvrščamo v skupino bioloških dejavnikov 1.

3.1.6.1 Izbrani bakterijski sevi

Anaerobne bakterijske seve *Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T (ATCC 8482; številka kromosoma v zbirki nukleotidnih zaporedij GenBank (Benson in sod., 2010) CP000139.1; Xu in sod., 2007; v nadaljevanju *B. vulgatus* DSM 1447), *Ruminococcus albus* 7^T (ATCC 27210; DSM 20455; številka kromosoma v zbirki GenBank CP002006.1; Purushe in sod.,

2010; v nadaljevanju *R. albus* 7) in *Prevotella ruminicola* Bryant 23^T (ATCC 19189; DSM 19721; številka kromosoma v zbirki GenBank CP002403.1; Suen in sod., 2011; v nadaljevanju *P. ruminicola* 23) smo izbrali za poskus zaradi njihovega znanega števila operonov *rrn*, znane dolžine genoma in medsebojne filogenetske sorodnosti (Preglednica 12).

Preglednica 12: Bakterijske sevi in razlogi za njihovo vključitev v poskus

Bakterijski sev	Deblo	Struktura celične stene	Število operonov <i>rrn</i>	Dolžina kromosoma [Mb]
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	<i>Bacteroidetes</i>	gramnegativna	7	5,16
<i>P. ruminicola</i> 23	<i>Bacteroidetes</i>	gramnegativna	4	3,62
<i>R. albus</i> 7	<i>Firmicutes</i>	grampozitivna	4	3,69

3.1.6.2 Kompetenten bakterijski sev *Escherichia coli* TOP10

Komercialno pripravljene celice bakterijskega seva *Escherichia coli* TOP10 (InvitrogenTM, ZDA; v nadaljevanju *E. coli* TOP10) omogočajo učinkovito transformacijo in večji donos plazmidov ob osamitvi. Sev TOP10 poseduje genotip: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80lacZΔM15 Δ*lacX74 recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (*Str*^R) *endA1 nupG* (InvitrogenTM, 2004). Kot selekcijski označevalec nosi zapis za odpornost proti antibiotiku streptomycinu.

3.1.7 Plazmida

Umetno kompetentne celice seva *E. coli* TOP10 smo s transformirali s plazmidnim vektorjem, ki ima kot selekcijski označevalec zapis za odpornost proti antibiotiku ampicilinu, čigar produkt pomembno karakterizira celico, ki ga nosi.

3.1.7.1 Plazmid pRH3

Vektorski plazmid pRH3, ki smo ga uporabili pri kontrolni transformaciji kompetentnih celic, je približno 3-krat večji (8,7 kb; Daniel in sod., 1995), kot pogosteje uporabljen plazmid pUC19 (2,7 kb; Yanisch-Perron in sod., 1985), zato smo pričakovali manjšo učinkovitost transformacije kot sicer (1×10^7 transgenih celic/μg dodatno zvite plazmidne DNA; Szostková in Horáková, 1998). Zapis za selekcijski označevalec (*Amp*^R) je omogočal pozitivno selekcijo transgenih celic na trdnem gojišču LB_{Amp}.

3.1.7.2 Plazmid pJET1.2/blunt

Vektorski plazmid pJET1.2/blunt (pJET1.2/blunt Cloning Vector, komplet »CloneJETTM PCR Cloning Kit«, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; Priloga B) smo s transformacijo vnesli v kompetentne celice. V spremenih celicah je plazmid prisoten v velikem številu kopij, zaradi česar je donosnost plazmidov ob njihovi osamitvi toliko večja. Vektor je bil konstrukt plazmida pUC19, z nadomeščenim 5'-terminalnim koncem

gena *lacZ*, ki kodira N-terminalni konec β-galaktozidaze (LacZ), z letalnim genom, ki kodira restriktivno endonukleazo Eco47I. Krožna molekula vektorja pJET1.2/blunt z manjkajočim vključkom izraža gen za letalni restriktivni encim Eco47I, ki po transformaciji ubije gostiteljsko celico *E. coli*. Poliklonsko mesto (angl. »multiple cloning site«) znotraj gena *eco47IR* (letalni gen, ki kodira restriktivni encim) je omogočalo selekcijo transgenih celic na osnovi pozitivnega selektivnega označevalca. Ker so na agarskih ploščah lahko zrasle samo rekombinantne celice z okvarjenim letalnim genom, zaradi uspešne vezave vključka v poliklonsko vektorsko mesto (angl. »lethal gene-disruption«), modro bela selekcija ni bila potrebna. Vektorski selektivni označevalci (Amp^R) pa je omogočal selekcijo transgenih celic na trdnem gojišču LB_{Amp}. Vse kolonije na gojišču LB_{Amp} so bile bele in rekombinantne (Ferme, 2008).

3.1.8 Začetni oligonukleotidi

Nekatere začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo, smo povzeli po literaturi, druge smo konstruirali *in silico*. Po naših navodilih so jih izdelali v podjetju Microsynth AG (Švica).

S široko specifičnima začetnima oligonukleotidoma (Preglednica 13 in 14), ki hibridizirata na visoko ohranjene prekrivajoče se regije, smo v verižni reakciji s polimerazo pomnoževali 16S rDNA izbranih bakterijskih sevov.

Za ugotavljanje prisotnosti rekombinantne DNA v knjižnicah rekombinantnih celic in vrstne identitete pomnožka gena, ki kodira 16S rRNA smo uporabili ozko specifične začetne oligonukleotide (Preglednica 15). Vrstno specifične začetne oligonukleotide, ki hibridizirajo na gene, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23, smo izbrali z bioinformacijskim orodjem Primrose 2 (Ashelford in sod., 2002). Po Abd-Elsalam-ovih (2003) kriterijih za izbiro začetnih oligonukleotidov in priporočilih bioinformacijskega podjetja Premier Biosoft International (PCR Primer Design Guidelines) smo z orodji OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.), Artemis (Rutherford in sod., 2000), ClustalX 2.1 (Chenna in sod., 2003; Larkin in sod., 2007) in Probe Match (Cole in sod., 2007; 2009) izbrali le najprimernejše. Posebno pozornost smo namenili še pregledu vrstne specifičnosti začetnih oligonukleotidov. Vsi specifični začetni oligonukleotidi so 100 % hibridizirali na gene, ki kodirajo 16S rRNA le njim specifičnih bakterijskih vrst in niso hibridizirali na gene, ki kodirajo 16S rRNA ostalih izbranih vrst v poskusu.

Prisotnost vključka v plazmidnem vektorju pJET1.2/blunt smo dokazovali z začetnima oligonukleotidoma (Preglednica 16 in 17; komplet »CloneJET™ PCR Cloning Kit«, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki hibridizirata na plazmid v bližini poliklonskega mesta.

Preglednica 13: Par široko specifičnih začetnih oligonukleotidov in njune lastnosti

Začetni oligonukleotid ^a	Zaporedje (5'→3') začetnega oligonukleotida	T _m [°C] ^d	G + C [%] ^e	Vir
fD1 ^b	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54,3	50,0	Weisburg in sod. (1991)
RU1406	ACGGGCGGTGTGTRC ^c	54,1	70,0	Olsen in sod. (1986)

Oznake:

^a f – k 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »forward«); R – k 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »reverse«).

^b Zaporedje fD1 kot v objavi Weisburg-a in sod. (1991), vendar brez 5'-povezovalnega zaporedja z restriktijskimi mesti.

^c Degenerirano nukleotidno mesto R označuje dušikovo bazo adenin ali gvanin. Razlika v zaporedju vpliva na odstotni delež vsote gvanina in citozina. Z gvaninom je delež večji, 73,3 %, z adeninom pa 66,7 %. V izračunu, podanem v preglednici 13, je upoštevano njuno povprečje.

^d Temperatura tališča je povzeta po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

^e Odstotni delež vsote gvanina in citozina je povzet po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

Preglednica 14: Lastnosti para široko specifičnih začetnih oligonukleotidov

Tarča	Dolžina pomnožka [bp] ^a	Mesto hibridizacije začetnega oligonukleotida ^b
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	1394	12-31 ^c ; 1391-1405 ^d
<i>P. ruminicola</i> 23	1396	-2-18 ^c ; 1380-1394 ^d
<i>R. albus</i> 7	1369	1-20 ^c ; 1355-1369 ^d

Oznake:

^a Pomnožek tarčne DNA pomnožene s parom začetnih oligonukleotidov fD1/RU1406 v verižni reakciji s polimerazo.

^b Oštevilčenje temelji na dolžini gena, ki kodira 16S rRNA trčega bakterijskega seva.

^c Mesto hibridizacije k 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjenega začetnega oligonukleotida.

^d Mesto hibridizacije k 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjenega začetnega oligonukleotida.

Preglednica 15: Pari vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov in njihove lastnosti

Tarča	Začetni oligonukleotid ^a	Zaporedje (5'→3') začetnega oligonukleotida	Dolžina pomnožka [bp]	T _m [°C] ^e	G + C [%] ^f	Mesto hibridizacije začetnega oligonukleotida na tarčo ^g	Vir
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	BvulF	ACAAGATGGCATCATGAGTC	846	52,5	45,0	181-200	ta študija ^h
	BvulR	CTTACGGCTTCACCGTAAT		52,7	45,0	1007-1026	ta študija ^h
<i>P. ruminicola</i> 23	PrumF	TATAGTAGAGAATAGCCCGG	466	49,9	45,0	132-151	ta študija ^h
	PrumR	TGATGATTAAGCGTGACGTG		52,9	45,0	578-597	ta študija ^h
<i>R. albus</i> 7	RalbF ^b	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTCG	124	53,2	45,5	1246-1267	Koike in Kobayashi (2001)
	RU1406 ^c	ACGGGCGGTGTGTRC ^d		54,1	70,0	1355-1369	Olsen in sod. (1986)

Oznake:

^a F – k 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »forward«); R – k 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »reverse«).

^b Zaporedje RalbF pri Koike-u in Kobayashi-ju (2001) poimenova Rf154f.

^c Vključkom rekombinantnega plazmidnega vektorja iz knjižnic transgenih celic smo ugotovili identiteto kljub uporabljenemu široko specifičnemu začetnemu oligonukleotidu RU1406.

^d Degenerirano nukleotidno mesto R označuje dušikovo bazo adenin ali gvanin. Razlika v zaporedju vpliva na odstotni delež vsote gvanina in citozina. Z gvaninom je delež večji, 73,3 %, z adeninom pa 66,7 %. V izračunu, podanem v preglednici 15, je upoštevano njuno povprečje.

^e Temperatura tališča je povzeta po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

^f Odstotni delež vsote gvanina in citozina je povzet po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

^g Oštevilčenje temelji na dolžini gena, ki kodira 16S rRNA trčnega bakterijskega seva.

^h Začetni oligonukleotid je bil izbran z bioinformacijskim orodjem Primrose 2 (Ashelford in sod., 2002).

Preglednica 16: Par začetnih oligonukleotidov, s prijemališčem na plazmidu pJET1.2/blunt, in njune lastnosti

Začetni oligonukleotid ^a	Zaporedje (5' → 3') začetnega oligonukleotida	Tm [°C]	G + C [%]	Vir
pJETf ^b	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74 ^d	61 ^f	Fermentas
pJETr ^c	AAGAACATCGATTTCATGGCAG	56,0 ^e	41,7 ^g	(2011)

Oznake:

^a f – k 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »forward«); r – k 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid, (angl. »reverse«).

^b Začetni oligonukleotid pJETf je po specifikaciji proizvajalca (Fermentas Thermo Fischer Scientific, ZDA) poimenovan pJET1.2 forward sequencing primer, 23-mer (#SO501).

^c Začetni oligonukleotid pJETr je po specifikaciji proizvajalca (Fermentas Thermo Fischer Scientific, ZDA) poimenovan pJET1.2 reverse sequencing primer, 24-mer (#SO511).

^d Temperatura tališča je povzeta po navodilih proizvajalca (Fermentas Thermo Fischer Scientific, ZDA).

^e Temperatura tališča je povzeta po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

^f Odstotni delež vsote gvanina in citozina je povzet po navodilih proizvajalca (Fermentas Thermo Fischer Scientific, ZDA).

^g Odstotni delež vsote gvanina in citozina je povzet po analizi z bioinformacijskim orodjem OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc.).

Preglednica 17: Lastnosti para začetnih oligonukleotidov, ki imata prijemališče na plazmidu pJET1.2/blunt

Tarča	Dolžina pomnožka [bp] ^a
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	1513
<i>P. ruminicola</i> 23	1515
<i>R. albus</i> 7	1488

Oznaka:

^a Pomnožek tarčne DNA pomnožen s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr v verižni reakciji s polimerazo.

3.2 METODE

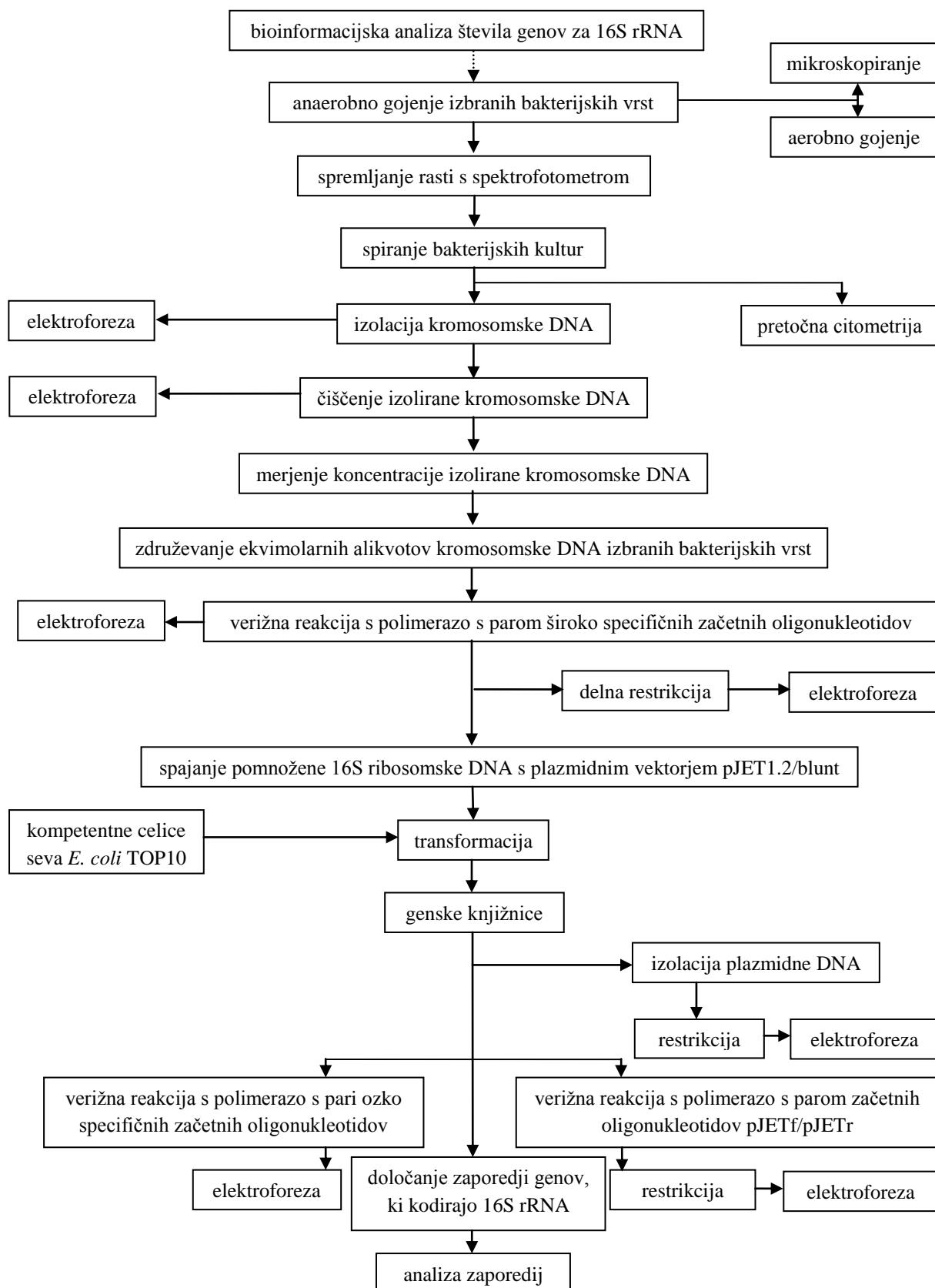
3.2.1 Bioinformacijska analiza števila operonov *rrn*

Z bioinformacijskimi orodji smo žeeli prešteti ribosomske operone v genomih bakterij, iz debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka. Z razvojem molekularno bioloških tehnik se je v zadnjih letih skokovito povečalo število nukleotidnih zaporedij genomov v javno dostopnih zbirkah, zato smo pričakovali širok informativen vzorec bakterij. Kromosome smo nabrali iz podatkovne baze GenBank (Benson in sod., 2010). V izbor nismo vključili striktne patogene ter probiotične bakterije, ki so bile izvorno izolirane iz prehrabnenih izdelkov. Iskanje ustreznih bakterijskih vrst smo si olajšali s pregledovanjem zbirke »Human Microbiome Project« (Turnbaugh in sod., 2007) in dostopne literature.

Ustvarili smo *in silico* zbirko kromosomov izbranih bakterijskih sevov. Genome, katerih nukleotidno zaporedje je v celoti znano (angl. »complete genomes«), smo shranili v ustrezeno poimenovano tekstovno datoteko (.txt) v formatu EMBL-Bank. Nukleotidna zaporedja z deloma znanim zaporedjem genomov bakterij (angl. »genomes in progress«) so bila obdelana s hitrim pristopom določanja zaporedja (»shotgun« ali 454 določanje zaporedja), zato so v zbirki deponirana kot nizi fragmentov. Zaporedja odsekov genoma smo shranili v samostojno (a za direktno obdelavo neuporabno) datoteko (.doc), jih združili

s programom EMBOSS GUI v1.14: union ter sestavljeni zaporedje genoma shraniti v tekstovno datoteko (.txt). Kromosomske zaporedje v formatu EMBL-Bank smo nato uvozili v bioinformacijski program Artemis (Rutherford in sod., 2000), ki nam je prikazal položaj vseh genov, ki kodirajo 16S, 23S in 5S rRNA. Rezultat smo preverili še z iskalnim algoritmom blanst (Altschul in sod., 1990) in ročno preverbo. Za hitrejšo in enostavnejšo obdelavo podatkov smo namestili lokalni blast z *in silico* informacijsko bazo zbranih kromosomov. Zaporedja genov, ki kodirajo 16S rRNA, ki smo jih kasneje temeljito analizirali, smo shranili tudi v formatu fasta (.fa/.fsa).

Želeli smo ugotoviti ali je število genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA znotraj in med bakterijskima debloma *Bacteroidetes* in *Firmicutes* raznoliko in ali se njuni mediani ter povprečni števili med debloma razlikujeta. Zanimalo nas je ali obstajajo razlike v srednji vrednosti števila genov, ki kodirajo 16S rRNA v naboru kvalitetne genomske informacije med vsemi bakterijskimi sevi, ki poseljujejo prebavnini trakt živali in človeka in med sevi le iz debelega črevesa.



Slika 3: Shematski prikaz poteka dela

3.2.2 Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

3.2.2.1 Anaerobno gojenje izbranih bakterijskih sevov

Čiste bakterijske kulture sevov smo pred gojenjem hranili v poltrdnem anaerobnem gojišču M2 pri -20 °C. Gojili smo jih v tekočem gojišču M2 v Hungate-ovih epruvetah (Bellco Glass Inc., ZDA) po Bryantovi modifikaciji Hungate-ove tehnike za gojenje anaerobnih mikroorganizmov (Bryant, 1972). Kulture smo precepljali ob prepihavanju kisika prostega CO₂.

Prekonočne kulture sevov, namenjene shranjevanju, smo precepili s sterilno inokulacijsko zanko v poltrdno gojišče M2. Po prekonočni inkubaciji pri 37 °C smo epruvete s sevi shranili pri -20 °C.

Čistost bakterijskih sevov in njihovo morfologijo smo preverjali in opazovali z mikroskopiranjem (fazno kontrastni mikroskop BX50 F3, Olympus, Japonska) nativnega preparata kulture. Možno kontaminacijo z aerobno kožno mikrobioto pa smo preverjali z nacepljanjem prekonočne kulture sevov na agarska gojišča LB, ki smo jih inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.2.2 Spremljanje rasti bakterijskih kultur v tekočem gojišču M2

Odmrznjene bakterijske kulture sevov, shranjene v poltrdnem gojišču M2, smo z inokulacijsko zanko anaerobno inokulirali v 10 ml tekočega gojišča M2. Sledila je prekonočna inkubacija pri 37 °C. Da so zagotovo vsi sevi dosegli stacionarno fazo rasti, smo 200 µl prekonočne kulture anaerobno precepili v tekoče gojišče M2 ter kulture preko nočni inkubirali pri 37 °C.

Zaradi naraščanja števila celic se je tekom inkubacije povečevala motnost gojišča, ki smo jo spremljali naslednji dan z merjenjem optične gostote pri 654 nm (spektrofotometer Novaspec® II, Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija), dokler OD₆₅₄ ni naraščala več. Še pred merjenjem optične gostote za spremmljanje rasti bakterijskih kultur smo spektrofotometer umerili s tekočim gojiščem M2, ki je bilo pripravljeno v isti seriji kot gojišče za poskus, saj svetlobo v bakterijskih kulturah absorbirajo in odbijajo tako celice kot komponente gojišča. Na optično gostoto bakterijskih kultur lahko poleg same gostote kulture vplivajo tudi drugi parametri, kot je kopiranje presnovkov v gojišču, zunajcelični matriks, velikost, granuliranost ter število mrtvih celic (Ferme, 2008). Zaradi različne hitrosti rasti posameznih sevov (angl. »growth rate«) in maksimalne stopnje rasti (angl. »growth maximum«) z metodologijo merjenja optične gostote potrdimo, da vsi sevi preidejo v stacionarno fazo. Ker pa je motnost kulture vendarle odvisna od velikosti in celičnih komponent, ki absorbirajo in odbijajo svetlobo, so meritve optične gostote vrstno specifične in zato absolutne vrednosti neprimerljive med različnimi mikrobi, celo med različnimi sevi iste vrste ne. A za večino enoceličnih organizmov so znotraj določenih meja spremembe optične gostote tekočih kultur sorazmerne s spremembami v številu celic,

vendar pa je določeno odstopanje prisotno pri tistih mikrobnih vrstah, katerih velikost ali oblika celic se spreminja tekom različnih faz rasti.

3.2.2.3 Spiranje bakterijskih kultur

Zaradi le enkratno centrifugiranega vampnega soka v semidefiniranem gojišču M2, kopiranja celičnih eksudatov in mrtvih celic, je bilo pred nadaljnji analitskimi metodami potrebno odstraniti moteče komponente v gojišču.

Po 10 ml prekonočnih bakterijskih kultur v stacionarni fazi rasti, smo prelili v ohlajene 50 ml-polipropilenske centrifugirke ter jih centrifugirali (centrifuga 2K15, Sigma Laborzentrifugen, Nemčija) 10 minut pri $10000 \times g$ in 0°C . Supernatant smo odlili v odlagalnik s tehničnim etanolom in usedlino resuspendirali v 10 do 20 ml ledeno hladnega pufra PBS (pH 7,4). Po centrifugiranju smo ponovili spiranje. Bakterijske celice *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 smo resuspendirali v 10 ml pufra PBS (pH 7,4), *R. albus* 7 pa zaradi počasnejše rasti le v 5 ml pufra. Alikvote (0,5 ml) resuspendiranih celic, v 1,5 ml mikrocentrifugirkah, smo centrifugirali, supernatant odlili v odlagalnik s tehničnim etanolom ter s polavtomatsko pipeto odstranili še ostanek supernatanta. Celične usedline smo do uporabe shranili pri -20°C .

3.2.2.4 Direktno štetje bakterijskih celic s pretočno citometrijo

Bakterijske celice v tekoči kulturi smo nameravali kvantificirati s pretočno citometrijo (angl. »flow cytometry«; Davey in Kell, 1996), ki omogoča natančno in hitro štetje delcev (celic). Pomembna prednost pretočne citometrije v primerjavi z mikroskopiranjem je, da je rezultat meritve manj odvisen od izvajalca. V primerjavi z alternativnimi metodami pa je hitrejša, občutljivejša, zagotavlja objektivnejše rezultate ter ponuja veliko možnosti analiz celičnih lastnosti (Darzynkiewicz in sod., 1997). V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam poda zanesljivo podobo o njihovih fizikalnih in biokemičnih lastnostih (Kotnik in sod., 2001).

V pretočni celici pretočnega citometra se zaradi hidrodinamičnega fokusiranja ustreznost redčen vzorec bakterijske kulture razporedi v tanek curek, kjer celice ena za drugo prehajajo mimo svetlobnega žarka (15 mW argonski laser, ki proizvaja svetlobo valovne dolžine 488 nm) in detektorjev. Svetlobni žarek, ki zadane ob celico, se odbije, lomi ali pa absorbira v fluorokromih, vezanih na celice, kateri nato oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine (Kotnik in sod., 2001). Fotodetektor stranskega odboja, ki zazna razpršeno svetlobo pravokotno od smeri vpadlega laserskega žarka ($15^{\circ} - 90^{\circ}$; Sharpless in sod., 1977), kvantitativno prevrednoti količino prejete svetlobe v relativno mero za granuliranost celice (Shapiro, 2003). Le-ta je posledica količine in lastnosti membranskih struktur celice (lizosomov, endoplazmatskega retikuluma, fagosomov, citoplazemske in jedrne membrane). Fluorescenčni detektor meri svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe (530 ± 15 nm). Preko sistema filtrov in zrcal fluorescenčni detektor prejme svetlobo določene valovne dolžine in izmeri signal, ki ga oddaja fluorokrom. Fotoelektrode pretvorijo svetlobne signale v električne, katere izmerimo, obdelamo z

ustreznimi računalniškimi programi in prikažemo v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov (Ihan, 1999).

Oprane tekoče kulture bakterijskih sevov smo redčili 2000-krat in 10000-krat v pufru PBS (pH 7,4), da smo prešli v optimalno območje delovanja pretočnega citometra. Ker pretočni citometer ne omogoča meritve analiziranega volumna vzorca, kvantifikacija bakterijskih celic poteka s primerjavo števila kroglic, dodanih v vzorec v zani koncentraciji. Po 495 µl redčenega alikvota kulture smo obarvali s fluorescentnim barvilom SYTO® 13 (5 mM; »Green Fluorescent nucleic acid strain«, Invitrogen Molecular Probes, ZDA). Barvilo smo sprva 20-krat redčili do delovne koncentracije (250 µM) ter ga nato dodali vzorcu v končni koncentraciji 1 µM. Dodali smo še 10 µl fluorescentnih lateksnih kroglic z znano končno koncentracijo (s 1250-kratnim redčenjem smo dodali večji volumen, s čimer smo se izognili preveliki napaki pri pipetiranju) s premerom 1 µm (Fluoresbrite PolyFluor 1 micron beads, Polysciences Inc., ZDA), ki so bile predhodno preštete pod mikroskopom s Petroff-Hausser-jevo števno komoro (Hausser Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Vzorec smo rahlo premešali na vibracijskem mešalu ter ga 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Kot kontroli smo naredili še: (i) samo kroglice v pufru PBS (pH 7,4) in (ii) pufru PBS (pH 7,4) smo dodali le barvilo. Vsak vzorec smo analizirali dvakrat, z vmesnim mešanjem na vibracijskem mešalu, s pretočnim citometrom (FacScan, Becton Dickinson, ZDA), ki smo ga upravljali z računalnikom Power Macintosh 7300 s programskim paketom za nabiranje in analizo podatkov (CELLQuest 3.1, FacScan).

Vsaka meritev s pretočnim citometrom je vsebovala 10000 dogodkov. Na dvodimenzionalnih točkovnih grafikonih stranskega odboja, v odvisnosti od zelene fluorescence, smo ločili regijo celic in regijo kroglic. Iz razmerja števila celic ter kroglic pa smo nameravali izračunati koncentracijo celic po formuli 1.

$$\text{število celic}/\text{ml} = \frac{\text{število celic}}{\text{število kroglic}} \times c_{\text{kroglic}} \times \text{redčitev vzorca} \quad \dots(1)$$

3.2.2.5 Izolacija kromosomske DNA

DNA iz usedlin bakterijskih kultur je bilo potrebno izolirati tako, da pridobimo čim več nukleinske kisline s čim manj nečistočami (Kakirde in sod., 2010), zato smo kromosomalno DNA izolirali z metodo po Ausubel-u (Ausubel in sod., 1999).

Odmrznjene celične usedline smo resuspendirali v 567 µl pufra TE (pH 8,0). Raztopini smo dodali 30 µl 10 ut. % NaDS in 3 µl proteinaze K. Suspenzijo smo močno pretresli, jo inkubirali 1 uro (temoblok CH-100, BioSan, Latvija) pri 50 °C, jo ohladili, ji dodali 100 µl 5 M NaCl in vsebino mikrocentrifugirke močno premešali. Dodali smo 80 µl raztopine CTAB/NaCl (10 ut. % CTAB, 0,7 M NaCl), segrete do 65 °C. Suspenzijo smo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke, jo inkubirali (temoblok CH-100, BioSan, Latvija) 10 minut pri 65 °C in ohladili. Mešanici smo v digestoriju dodali 780 µl kloroform, jo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in centrifugirali (centrifuga Mikro 200R, Hettich Centrifuge, Velika Britanija) 5 minut pri 10000 × g in sobni temperaturi. Vodno fazo smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in ji dodali enak volumen mešanice fenol/kloroform/izoamilalkohol (25:24:1; vol. %). Emulzijo smo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke, jo centrifugirali ter ekstrakcijo ponovili še s kloroformom. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, raztoplje nukleinske kisline pa nato oborili

z dodatkom 0,6-kratnega volumna izopropanola. Po centrifugiraju smo vodno fazo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali. Supernatant smo odlili v odlagalnik s tehničnim etanolom, oborino ter stene mikrocentrifugirke pa sprali z 1 ml 70 vol. % ledeno hladnega etanola. Mešanico smo premešali in centrifugirali. Previdno smo odlili supernatant ter oborino osušili v odprti mikrocentrifugirki do suhega. Izolirano kromosomsko DNA smo raztopili v 50 µl pufra TE (pH 8,0) z dodanimi 0,25 µl RNaze A ter raztopino inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, izolirano DNA pa shranili pri -20 °C.

3.2.2.6 Priprava agaroznega gela in horizontalna gelska elektroforeza

Uspešnost izolacije kromosomske in plazmidne DNA, prisotnost, količino, kvaliteto ter dolžino produktov verižne reakcije s polimerazo in cepljenih odsekov DNA smo preverjali s horizontalno agarozno gelsko elektroforezo v 0,5-kratnem pufru TBE.

V primerno steklovino smo nalili 40 ali 60 ml (Preglednica 18) 0,5-kratnega pufra TBE in dodali ustrezno količino agaroze – zamreženost gelov (0,7 – 1,2 ut. % delež agaroze) smo izbrali glede na pričakovano dolžino DNA. Erlenmajerico smo postavili v mikrovalovno pečico in segrevali toliko časa, da je njena vsebina počasi zavrela. Raztopino smo premešali, jo še enkrat prevreli in ohladili do 60 °C. Medtem smo pripravili vpet nosilec za gel z vstavljenim primernim glavnikom, ki je omogočal nastanek vdolbinic za vnos vzorcev. Gel smo razlili in počakali, da se je strdil pri sobni temperaturi. Plastični nosilec s strjenim gelom smo prenesli v elektroforezno banjico (Mini Sub® Cell GT ali Wide Mini Sub® Cell GT, BioRad Laboratories, ZDA) in zalili s 0,5-kratnim pufrom TBE, tako da je bil gel potopljen. Previdno smo odstranili glavnik in pričeli z vnašanjem vzorcev v vdolbinice gela. Na parafilmu smo pomešali 1 µl nanašalnega pufra tipa IV (angl. »loading dye«; Sambrook in Russell, 2001) s 5 µl vzorca DNA. Mešanico vzorca in barvila smo vnesli v jamice agaroznega gela, kamor smo vnesli tudi 3 µl raztopine umerjenega velikostnega standarda (v končni koncentraciji 0,1 µg/µl; »GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix, Fermentas«, Thermo Fischer Scientific, ZDA; Priloga A). Elektroforeza (elektroforezni napajalnik EPS 600, Pharmacia Biotech, Švedska ali PowerPac, BioRad, ZDA) je tekla pri napetosti 100 V, v anodni smeri. Po končani elektroforezi smo gel barvali 10 minut v vodni raztopini etidijevega bromida in ga nato še razbarvali 20 minut v destilirani vodi. DNA v gelu smo odkrivali z vzbujanjem pri valovni dolžini 302 nm in sliko dokumentirali s transluminatorjem (GelDoc 1000, BioRad Laboratories, ZDA) ter z nadgrajenim sistemom za zajemanje in obdelavo slike (Molecular Analyst Software 1.4, BioRad Laboratories, ZDA).

Preglednica 18: Maksimalna globina jamice glede na površino in volumen agaroznega gela

Površina [cm ²]	Volumen [ml]	Maksimalna globina jamice [cm]
7 × 10	40	0,7
15 × 10	60	0,5

3.2.2.7 Čiščenje in koncentriranje izolirane DNA

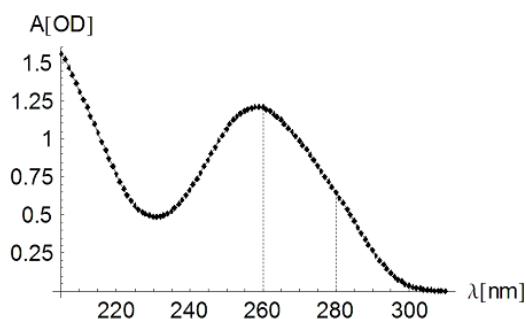
Po izolaciji kromosomske DNA in verižni reakciji s polimerazo je bilo potrebno odstraniti z RNazo A narezane oligonukleotide, nehibridizirane začetne oligonukleotide, ostanke dNTP-jev in ostale komponente reakcijske zmesi. Pri postopku čiščenja in koncentriranja smo sledili navodilu proizvajalca kompleta reagentov »High Pure PCR Product Purification Kit« (Roche Applied Science, Nemčija).

Čiščenje temelji na selektivni vezavi nukleinskih kislin na filter iz steklenih vlaken, v namenski mikrocentrifugirki, v prisotnosti kaotropnih soli (gvanidin HCl). Skozi serijo korakov spiranja se odstranijo nečistoče, imobilizirane nukleinske kisline pa eluiramo s pufom tris-HCl. Kromosomska DNA smo eluirali z dodatkom 100 µl eluacijskega pufra (angl. »elution buffer«), pomnožke verižne reakcije s polimerazo pa s 50 µl pufra. Uspešnost čiščenja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, očiščeno in skoncentrirano raztopino nukleinskih kislin pa shranili pri -20°C.

3.2.2.8 Merjenje koncentracije izolirane kromosomske DNA

Po izolaciji, čiščenju in koncentriranju kromosomske DNA v raztopini smo s spektrofotometrom (UV-160A, Shimadzu Corporation, Japonska) posredno izmerili njeni koncentracijo in kvaliteto. Pri merjenju absorbance vzorca v kvarčnih kivetah (Hellma GmbH & Co.KG, Nemčija; z dolžino optične poti 10 mm) je meritev skozi 2,5 ml kiveta, ki je vsebovala le vodo MQ, služila kot referenčna vrednost za odštevanje šuma odzadja, izmerjenega pri valovni dolžini 320 nm. Druga, 0,5 ml kiveta, pa je vsebovala raztopino molekul DNA, ki smo jo pred meritvijo 33,3-krat redčili z vodo MQ. Spektrofotometer je izmeril absorbanci pri 260 nm in 280 nm ter podal vrednost njunega količnika.

Valovna dolžina maksimalne absorbcije in absorpcijski maksimum molekule DNA sta odvisna od bazne sestave DNA in njene urejenosti v dvojnoverižno strukturo. Absorpcijski maksimum je blizu valovne dolžine 260 nm. To pomeni, da ima koeficient molarne absorptivnosti (ϵ) in s tem absorbanca pri tej valovni dolžini lokalni maksimum (Slika 4). Minimum UV absorpcijskega spektra pa molekula izraža pri valovni dolžini 230 nm. S pomočjo UV-vidnega spektra absorbance lahko ocenimo tudi čistost raztopine DNA – odsotnost ostalih polimerov, katerih absorpcijski maksimum je okrog 280 nm.



Slika 4: Tipična oblika UV-vidnega spektra absorbcijske DNA (Polyanichko in sod., 2004)

Oznaka:

ⁱ Vrednosti pri $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ in $\lambda = 280 \text{ nm}$ posredno podajata koncentracijo DNA v raztopini in njeni čistost.

Pri izračunu koncentracije DNA v raztopini upoštevamo, da je 1 enota $A_{260} \equiv 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ dvojnoverižne molekule DNA. Empirične izkušnje kažejo, da razmerje A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2,0 (Sambrook in Russell, 2001) ustreza čisti raztopini DNA (Glaser, 1995). Razmerje večje od 2,0 opozarja na visoko vsebnost RNA v vzorcu, manjše od 1,8 pa na povečano količino beljakovin ali fenola. Toda na razmerje A_{260}/A_{280} vpliva več dejavnikov. Meritve pri valovni dolžini 260 nm so merjene v bližini vrha absorpcijskega spektra nukleinskih kislin, medtem ko so meritve pri 280 nm izmerjene v delu spektra z zelo strmim pobočjem točkovne razvrstitev absorbance (Slika 4). Že manjše razlike meritve valovne dolžine pri in okoli 280 nm, zato povzročijo večje spremembe v razmerju A_{260}/A_{280} , kot razlike pri 260 nm. Meritve različnih spektrofotometričnih inštrumentov tako odražajo različna razmerja A_{260}/A_{280} , zaradi njihove variabilne natančnosti meritve valovne dolžine.

Natančnejši izračun koncentracije nukleinskih kislin omogoča Warburg – Christian-ova formula (Warburg in Christian, 1942):

$$c_{NK} = (62,9 \times A_{260}) - (36,0 \times A_{280}) \quad \dots(2)$$

3.2.2.9 Ekvimolarni alikvoti izolirane kromosomske DNA

Izolirano in očiščeno kromosomske DNA izbranih bakterijskih vrst smo ustrezeno redčili tako, da so posamezni alikvoti vsebovali enako število kromosomov vsake vrste.

Preglednica 19: Molska masa deoksinukleotidov

Deoksinukleotid ^a	Mr [g/mol]	Povprečje Mr [g/mol]
dGMP	380,23	
dCMP	340,20	360,22
dTMP	355,21	
dAMP	364,23	359,72

Oznaka:

^a Deoksinukleotid je sestavljen iz sladkorja 2'-deoksiriboze (134,13 g/mol), dušikove baze (gvanina (151,13 g/mol), citozina (111,10 g/mol), timina (126,11 g/mol) ali adenina (135,13 g/mol)) in fosfatne skupine (94,97 g/mol).

Preglednica 20: Dolžine kromosomov in deleži dušikovih baz

Vrsta	Dolžina kromosoma [b] ^a	G + C [%]	Število baz G + C	A+T [%]	Število baz A + T
<i>B. vulgaris</i> DSM 1447	5163189	42,20 ^b	2147886,62	57,80	3015302,38
<i>P. ruminicola</i> 23	3619559	47,68 ^c	1725805,73	52,32	1893753,27
<i>R. albus</i> 7	3685408	43,6 ^d	1606837,89	56,4	2078570,11

Oznake:

^a Dolžina kromosoma je povzeta po podatkovni zbirki GenBank (Benson in sod., 2010) in preverjena z bioinformacijskim orodjem »DNA/RNA/Protein/Chemical Molecular Weight Calculator« (Chang Bioscience).

^b Povzeto po objavi Kosuge-ja in sod. (2006).

^c Povzeto po Kryukov (2012)

^d Povzeto po objavi Suen-a in sod. (2011).

S pomnožkom števila dušikovih baz gvanina in citozina v kromosому (Preglednica 20), s povprečno molsko maso njunih deoksinuklotidov (Preglednica 19), z dodano sumo pomnožka števila baz adenina in timina s povprečno molsko maso pripadajočih

deoksinuklotidov, smo izračunali molsko maso dvojnoverižne kromosomske DNA v bakterijski celici (Preglednica 21).

Preglednica 21: Molska masa dvojnoverižne kromosomske DNA v bakterijski celici

Vrsta	Mr [g/mol]
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	3716752580,78
<i>P. ruminicola</i> 23	2605781332,69
<i>R. albus</i> 7	2653036769,41

Iz izračunanih molskih mas kromosomov (Preglednica 21) smo preračunali ekvimolarna razmerja DNA med izbranimi bakterijskimi vrstami (Preglednica 22).

Preglednica 22: Ekvimolarni razmerji kromosomske DNA med izbranimi bakterijskimi vrstami

Izbrani bakterijski vrsti	Ekvimolarno razmerje DNA
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 : <i>P. ruminicola</i> 23	1,426:1
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 : <i>R. albus</i> 7	1,401:1

Iz ekvimolarnih razmerji kromosomskih DNA (Preglednica 22) smo po formuli 3 (primer se nanaša na razmerje *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7), upoštevajoč meritve koncentracije DNA v raztopini (Preglednica 38), izračunali alikvote z enakim številom kromosomov vsake vrste (Preglednica 23).

$$V_{B. vulgatus \text{ DSM } 1447} = 1,401 \times \frac{C_{DNA \text{ } R. albus \text{ } 7}}{C_{DNA \text{ } B. vulgatus \text{ DSM } 1447}} \times V_{R. albus \text{ } 7} \quad \dots (3)$$

Preglednica 23: Volumni alikvotov z enakim številom kromosomov vsake vrste

Izbrani bakterijski vrsti	V [μ l]
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	6,67
<i>P. ruminicola</i> 23	1,00
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	3,73
<i>R. albus</i> 7	1,00

Z natančno izračunanimi in pazljivo odpipetiranimi volumeni smo zagotovili ekvimolarni delež kromosomske DNA obeh bakterijskih vrst. Preveliki napaki ob pipetiranju smo se izognili z 2-kratnimi volumeni izračunanih alikvotov.

3.2.2.10 Verižna reakcija s polimerazo

Sočasno z razvojem molekularne filogenije je prišlo do razvoja metod, ki so premostile večino težav tradicionalnih mikrobioloških pristopov pri raziskavah prokariontov v njihovih naravnih okoljih. Mnoge tipizacijske tehnike in metode za proučevanje pestrosti v kompleksnih okoljih temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin v verižni reakciji s polimerazo (Klemenčič, 2006). Reakcija omogoča hitro *in vitro* pomnoževanje tarčnih odsekov DNA z uporabo termostabilne *Taq* polimeraze. Produkt verižne reakcije s polimerazo se od *in vivo* sintetizirane DNA loči, da ima na 3'-koncu dodaten adenin ter na 5'-koncu nima fosforilirane hidroksilne skupine. A omenjeni razliki povzročata težave pri povezovanju pomnoženih tarčnih odsekov DNA s plazmidnim vektorjem. Izognemo se jim lahko na tri načine: (i) z odstranitvijo odvečnega adenina s 3'→5' ekszonukleazo in hkratno fosforiliranje s T4 kinazo, (ii) z uporabo vektorjev z dodatnim timinom na 3'-koncu

(pJET1.2/blunt) ali **(iii)** z dodanimi restriktionskimi mesti na 5'-koncu začetnega oligonukleotida (Žgur – Bertok in Starčič Erjavec, 2008). Na verižni reakciji s polimerazo temelječe metode pa so poleg specifičnih težav obremenjene še z vsemi pomanjkljivostmi reakcije: nespecifična hibridizacija začetnih oligonukleotidov, občutljivost polimeraze za inhibitorje (fenol), fragmentiranost tarčne DNA poveča verjetnost nastanka himernih zaporedji – artefaktov pomnoževanja, možno je tudi preferenčno pomnoževanje nekaterih zaporedji (Klemenčič, 2006).

Vsi pari začetnih oligonukleotidov, uporabljeni v okviru našega dela, so zajeti v plegl. 13, 15, 16. Mešanice smo pripravljali v sterilnih 0,2 ml mikrocentrifugirkah (Plastibrand®, Nemčija) ali v sterilnih traktih dvanajsterih 0,2 ml centrifugirkah (Plastibrand®, Nemčija). Reakcijske mešanice so vsebovale reagente v končnih koncentracijah kot je navedeno v Preglednici 26, 27 in matrično DNA. Ob pomnoževanju tarčnih odsekov 16S rDNA z univerzalnim parom začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) ter tekom optimizacije protokola verižne reakcije s polimerazo, smo dopolnjevali končni volumen do 20 µl. Ob pomnoževanju produktov, namenjenih ugotavljanju vrste identitete gena, ki kodira 16S rRNA iz knjižnic transgenih celic pa smo volumen vseh reagentov in matrične DNA v reakcijski mešanici zmanjšali za četrtino. Pomnoževanje tarčnih odsekov je potekalo v cikličnem sistemu za toplotno pomnoževanje nukleinski kislin (GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems, ZDA ali MyCycler™, thermal cycler, BioRad Laboratories, ZDA) po protokolih, navedenih v Preglednica 24 in 25. Količino, kakovost in prisotnost produkta smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo, mikrocentrifugirke z njihovo vsebino pa smo shranili pri -20 °C.

Preglednica 24: Protokol verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz osamljene kromosomske in plazmidne DNA

Protokol	T [°C]	t [min]	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	95	0,30	
Hibridizacija začetnih oligonukleotidov	52	0,30	30
Podaljševanje	72	1,15	
Končno podaljševanje	72	5	1
Vzdrževanje	4	∞	/

Preglednica 25: Protokol verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz knjižnic transgenih celic

Protokol	T [°C]	t [min]	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	95	0,30	
Hibridizacija začetnih oligonukleotidov	52	0,30	30
Podaljševanje	72	0,45	
Končno podaljševanje	72	5	1
Vzdrževanje	4	∞	/

Preglednica 26: Reagenti in njihova koncentracija v reakcijski mešanici verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz osamljene kromosomske DNA in rekombinantne DNA iz knjižnic transgenih celic

Reagenti reakcijske mešanice	Založna koncentracija reagenta	Končna koncentracija reagenta	V
<i>Taq</i> pufer s KCl-om ^a	10 ×	1 ×	2,0
MgCl ₂ ^a	25 mM	2 mM	1,6
mešanica dNTP-jev ^{a, b}	2 mM	0,2 mM	2,0
začetni oligonukleotid F ^c	2 µM	0,2 µM	2,0
začetni oligonukleotid R ^d	2 µM	0,2 µM	2,0
<i>Taq</i> DNA polimeraza ^a	10 U/µL	0,05 U/µL	0,1
voda brez nukleaz ^e	/	/	9,3
matrična DNA ^f	/	/	1,0
končni volumen			20,0

Oznake:

^a Reagente reakcijske mešanice verižne reakcije s polimerazo proizvaja Fermentas (Thermo Fischer Scientific, ZDA).

^b Mešanica deoksinukleozid trifosfatov sestoji iz dATP, dCTP, dGTP in dTTP.

^c F – k 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »forward«).

^d R – k 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (angl. »reverse«).

^e Vodo brez nukleaz proizvaja Sigma-Aldrich (ZDA).

^f Pri pomnoževanju tarčnega odseka 16S rDNA z univerzalnim parom začetnih oligonukleotidov (Preglednica 13) smo kot matrično DNA uporabili osamljeno kromosomsko DNA. Pri pomnoževanju, namenjenemu ugotavljanju vrstne identitete gena, ki kodira 16S rRNA (Preglednica 15) pa smo uporabili rekombinantno DNA transgenih celic iz izdelanih genskih knjižnic.

^g Volumen reakcijske mešanice ene reakcije.

Preglednica 27: Reagenti in njihove koncentracije v reakcijski mešanici verižne reakcije s polimerazo za pomnoževanje tarčnega odseka 16S rDNA iz plazmidne DNA

Reagenti reakcijske mešanice	Založna koncentracija reagenta	Končna koncentracija reagenta	V [µL] ^g
<i>Taq</i> pufer s KCl-om ^a	10 ×	1 ×	2,0
MgCl ₂ ^a	25 mM	1,5 mM	1,2
mešanica dNTP-jev ^{a, b}	2 mM	0,2 mM	2,0
začetni oligonukleotid pJET1.2f ^c	10 µM	0,2 µM	0,4
začetni oligonukleotid pJET1.2r ^d	10 µM	0,2 µM	0,4
<i>Taq</i> DNA polimeraza ^a	10 U/µL	0,05 U/µL	0,1
voda brez nukleaz ^e	/	/	12,9
matrična DNA ^f	/	/	1,0
končni volumen			20,0

Oznake:

^a Reagente reakcijske mešanice verižne reakcije s polimerazo proizvaja Fermentas (Thermo Fischer Scientific, ZDA).

^b Mešanica deoksinukleozid trifosfatov sestoji iz dATP, dCTP, dGTP in dTTP.

^c K 3'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (f – angl. »forward«).

^d K 5'-koncu gena, ki kodira 16S rRNA obrnjen začetni oligonukleotid (r – angl. »reverse«).

^e Vodo brez nukleaz proizvaja Sigma-Aldrich (ZDA).

^f Pri pomnoževanju celotne dolžine vključka v plazmidnem vektorju pJET1.2/blunt s parom začetnih oligonukleotidov iz kompleta »CloneJET™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; pJET1.2f/pJET1.2r; Preglednica 17) smo pomnoževali rekombinantno DNA transgenih celic iz izdelanih genskih knjižnic.

^g Volumen reakcijske mešanice ene reakcije po navodilu proizvajalca kompleta »CloneJET™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA).

3.2.2.11 Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo

Primerno restriktijsko endonukleazo smo izbrali iz baze restriktijskih encimov NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA). Restriktijska mesta v vseh operonih *rrn* izbranih bakterijskih vrst smo preverili z bioinformacijskima orodjem ClustalX2 (Larkin in sod., 2007) in Artemis (Rutherford in sod., 2000). Dolžine cepljenih odsekov DNA so morale jasno ločevati vrsti.

3.2.2.11.1 Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo z restriktijsko endonukleazo *AvaII*

V verižni reakciji s polimerazo smo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) pomnožili tarčne odseke genov, ki kodirajo 16S rRNA iz matrične kromosomske DNA. Namnožene in očiščene pomnožke smo cepili z restriktijsko endonukleazo *AvaII* – izoshizomer encima *Eco47I* (Preglednica 28).

Preglednica 28: Prepoznavno zaporedje restriktijske endonukleaze *AvaII* in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi

Restriktijska endonukleaza	Prepoznavno zaporedje	Tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi
<i>AvaII</i>	5'-G ⁺ GWCC-3 ^a	lepljivi konci

Oznaka:

^a Degenerirano nukleotidno mesto W označuje dušikovo bazo adenin ali timin.

Restriktijska mešanica je vsebovala:

- 8,5 µl produkta verižne reakcije s polimerazo (\approx 50 ng)
- 1 µl 1-kratnega pufra Buffer R⁺ z BSA (10-kratna končna koncentracija; Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; 10 mM tris-HCl (pH 8,5 pri 37 °C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA)
- 0,5 µl restriktijske endonukleaze *AvaII* (10 U/µl; Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; encim shranjujemo v mešanici 10 mM tris-HCl (pH 7,4 pri 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA in 50 vol. % glicerolu)

Mikrocentrifugirke so bile ves čas na ledu. Restriktijsko mešanico smo premešali, vsebino mikrocentrifugirke pa zbrali s kratkotrajnim centrifugiranjem (3 – 5 sekund, 10000 × g, sobna temperatura; angl. »short spin«; centrifuga Mini Spin Plus, Eppendorf, Nemčija). Mešanico smo inkubirali 2-uri v vodni kopeli pri 37 °C. Profil cepljenih odsekov DNA (Preglednica 29, Slika 5) pa smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

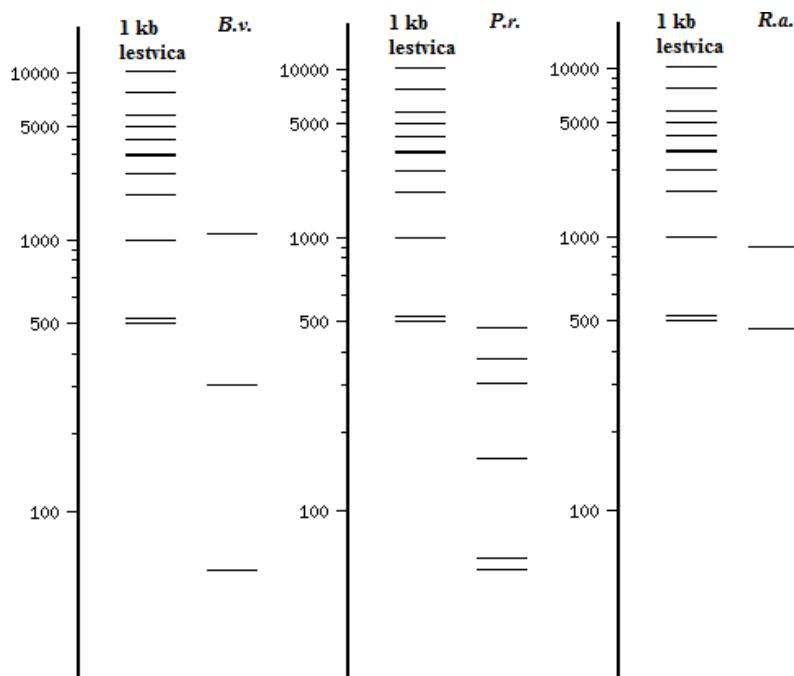
Preglednica 29: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo *AvaII*

Vrsta	Dolžina pomnožka [bp] ^a	Dolžine cepljenih odsekov DNA [bp] ^b
<i>B. vulgaris</i> DSM 1447	1394	303, 26, 1065
<i>P. rumnicola</i> 23	1396	303, 26, 164, 41, 480, 382
<i>R. albus</i> 7	1369	894, 475

Oznaki:

^a Pomnožki tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženi s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) v verižni reakciji s polimerazo.

^b Podatki povzeti po *in silico* restriktijski analizi z bioinformacijskim orodjem baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).



Slika 5: Analiza dolzin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgaris* DSM 1447 (**B.v.**), *P. ruminicola* 23(**P.r.**) in *R. albus* 7 (**R.a.**) cepljenih z endonukleazo *AvaII*

Oznaka:

ⁱ *In silico* elektroforezni geli z 1 ut. % deležem agaroze ter vnešenim umerjenim velikostnim standardom (1-kb lestvica) so povzeti iz baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).

3.2.2.11.2 Cepitev produktov verižne reakcije s polimerazo z restriktijsko endonukleazo *TaqI*

Zaradi neuspešne cepitve pomnoženih tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 z endonukleazo *AvaII*, smo ponovili cepitev s termostabilno endonukleazo *TaqI* (Preglednica 30).

Preglednica 30: Prepoznavno zaporedje restriktijske endonukleaze *TaqI* in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi

Restriktijska endonukleaza	Prepoznavno zaporedje	Tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi
<i>TaqI</i>	5'-T ⁺ CGA-3'	lepljivi konci

Restriktijska mešanica je vsebovala:

- 8,5 µl produkta verižne reakcije s polimerazo (\approx 50 ng)
- 1 µl 1-kratnega pufra NEBuffer 4 (v 10-kratni končni koncentraciji; NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA; 20 mM tris-acetat, 50 mM kalijev acetat, 10 mM magnezijev acetat, 1 mM DTT; pH 7,9 pri 25 °C)
- 0,5 µl restriktijske endonukleaze *TaqI* (10 U/µl; Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; encim shranjujemo v mešanici 10 mM tris-HCl (pH 7,5 pri 25 °C), 300 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mg/ml BSA in 50 vol. % glicerolu).

Mikrocentrifugirke so bile ves čas na ledu. Restriktijsko mešanico smo premešali, vsebino mikrocentrifugirke pa zbrali s kratkotrajnim centrifugiranjem (3 – 5 sekund, 10000 × g, sobna temperatura; angl. »short spin«; centrifuga Mini Spin Plus, Eppendorf, Nemčija). Mešanico smo inkubirali 2 uri v temobloku (CH-100, BioSan, Latvija) pri 65 °C. Profil cepljenih odsekov DNA (Preglednica 31, Slika 6) pa smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

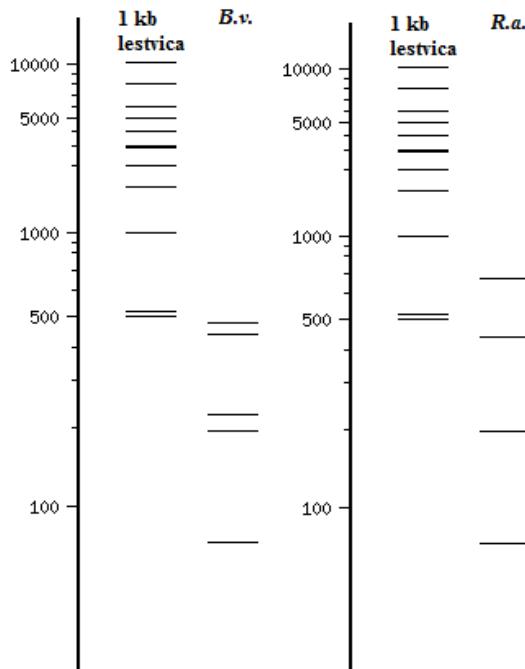
Preglednica 31: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo *TaqI*

Vrsta	Dolžina pomnožka [bp] ^a	Dolžine cepljenih odsekov DNA [bp] ^b
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	1394	55, 222, 479, 195, 443
<i>R. albus</i> 7	1369	55, 675, 198, 441

Oznaki:

^a Pomnožki tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA pomnoženi s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) v verižni reakciji s polimerazo.

^b Podatki povzeti po *in silico* restriktijski analizi z bioinformacijskim orodjem baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).



Slika 6: Analiza dolžin odsekov genov, kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**B.v.**) in *R. albus* 7 (**R.a.**) cepljenih z endonukleazo *TaqI*

Oznaka:

ⁱ *In silico* elektroforezni geli z 1 ut. % deležem agaroze ter vnešenim umerjenim velikostnim standardom (1-kb lestvica) so povzeti iz baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).

3.2.2.12 Izdelava genskih knjižnic

Po 3 ml steriliziranega tekočega gojišča LB smo alikvotirali v sterilne epruvete, mu dodali 30 µl antibiotika streptomicina (v založni koncentraciji 100 mg/ml) in ga inokulirali s 30 µl bakterijske kulture seva *E. coli* TOP10. Sledila je inkubacija preko noči pri 37 °C s stresanjem (inkubatorski stresalnik Unitron Plus, isis, Irska) pri 220 vrtljajih/minuto.

3.2.2.12.1 Spremljanje rasti bakterijskega seva *E. coli* TOP10 v tekočem gojišču LB_{Sm}

Po 1 ml prekonočne kulture *E. coli* TOP10 smo inokulirali v 50 ml tekočega gojišča LB_{Sm}, ogretega na 37 °C. Bakterijsko kulturo smo inkubirali pri 37 °C s stresanjem (inkubatorski stresalnik Unitron Plus, isis, Irska) pri 250 vrtljajih/minuto do koncentracije 10⁸ celic/ml (približno 2-uri). Zaradi naraščanja števila celic se je povečevala motnost, ki smo jo spremļjali z merjenjem optične gostote pri 600 nm (spektrofotometer Novaspec® II, Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija) vse do 0,4. Ker svetlobo v bakterijskih kulturah absorbirajo in odbijajo tako celice kot sestavine gojišča, smo pred merjenjem optične gostote spektrofotometer umerili s tekočim gojiščem LB, ki je bil pripravljen v isti seriji kot gojišče za poskus.

3.2.2.12.2 Priprava kompetentnih celic

Kompetentne celice smo pripravili s CaCl₂. Ostanek bakterijske kulture seva *E. coli* TOP10 v tekočem gojišču LB_{Sm} smo prenesli v dve ledeno hladni sterilni 50 ml polipropilenski centrifugirki, inkubirali 10 minut na ledu in nato centrifugirali (centrifuga 2K15, Sigma Laborzentrifugen, Nemčija) 10 minut pri 2700 × g in 4 °C. Supernatant smo odlili v odlagalnik s tehničnim etanolom ter s polavtomatsko pipeto odstranili ostanek supernatanta. Usedlino smo z obračanjem centrifugirk resuspendirali v približno 20 ml ledeno hladnega sterilnega 0,1 M CaCl₂. Vsebino centrifugirk smo združili, inkubirali 10 minut na ledu ter centrifugirali. Supernatant smo odlili in odstranili še ostanek. Bakterijske celice smo resuspendirali v dobro premešani (vibracijsko mešalo PV-1, Grand-bio, Velika Britanija) raztopini 2 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂ z dodanimi 0,325 ml sterilne raztopine 50 vol. % glicerola. Po 100 µl tako pripravljene suspenzije celic smo alikvotrali z ohljenimi nastavki za polavtomatsko pipeto v ledeno hladne 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirke, jih hipno zamrznili v podhlajenem tehničnem etanolu ter jih do uporabe hranili pri -70 °C.

3.2.2.12.3 Pozitivna kontrolna transformacija

S pozitivno kontrolo smo preverili učinkovitost transformacije saj je priporočljivo, da za transformacijo s kompletom »CloneJET™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA) uporabimo kompetentne celice *E. coli* s potencialno zmožnostjo učinkovitosti transformacije vsaj 1 × 10⁶ transgenih celic/µg dodatno navite plazmidne DNA.

Mikrocentrifugirko s 100 µl umetno kompetentnih celic seva *E. coli* TOP10 smo 15 minut inkubirali na ledu. Dodali smo 2 µl dodatno navite plazmidne DNA (150 ng DNA plazmida pRH3), previdno premešali ter inkubirali 30 minut na ledu. Celice smo izpostavili toplotnemu šoku tako, da smo mikrocentrifugirko inkubirali 90 sekund pri 42 °C (termoblok CH-100, BioSan, Latvija). Nato smo jo nemudoma prenesli na led, inkubirali 1 – 2 minuti ter dodali 400 µl sterilnega tekočega gojišča LB sobne temperature. V vodni kopeli smo kulturo ogreli do 37 °C (10 – 15 minut), čemur je sledila 1-urna inkubacija s stresanjem (inkubatorski stresalnik Unitron Plus, isis, Irska) pri 250 vrtljajih/minuto in 37 °C. Tako se je izvalo izražanje antibiotske odpornosti proti ampicilinu – antibiotik deluje kot selektivni dejavnik, ki omogoča rast le uspešno transformiranim celicam, ki so dobine v plazmidu zapisano odpornost proti antibiotiku (gen bla). Z drigalski spatulo smo razmazali

100 µl transformirane bakterijske kulture in 100 µl njene 10-kratne redčine na trdni selekcijski gojišči LB_{Amp}. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

Možnost kontaminacije z aerobno kožno mikrobioto smo preverjali z negativno kontrolo. Alikvotu kompetentnih celic nismo dodali plazmidne DNA, temveč le 400 µl sterilnega tekočega gojišča LB. Z drigalski spatulo smo 100 µl kulture celic razmazali na selekcijsko gojišče LB_{Amp}. Po prekonočni inkubaciji pri 37 °C nismo pričakovali bakterijskih kolonij.

Naslednji dan smo agarske plošče pregledali, prešteli kolonije in izračunali učinkovitost transformacije (angl. »transformation efficiency«) po formuli 4.

$$\text{ucinkovitost transformacije} = \frac{\text{število transgenih celic}}{\mu\text{g dodatno navite plazmidne DNA}} \quad \dots (4)$$

3.2.2.12.4 Povezovanje tarčnih odsekov DNA s plazmidnim vektorjem

Pomnožke tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnožene v verižni reakciji s polimerazo s parom univerzalnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406), smo povezali s plazmidnim vektorjem po navodilih proizvajalca kompleta »CloneJRT™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA), v treh ponovitvah. Ker je bila 16S rDNA podvojena s *Taq* DNA polimerazo, so imeli pomnožki 3'-dA kohezivne konce (angl. »sticky-end«), vektor (plazmid pJET1.2/blunt) pa tope konce (angl. »blunt-end«). Po navodilu proizvajalca smo zato pripravili reakcijo »blunting« z DNA »blunting« encimom vključenim v komplet. Le-ta odstrani 3'-konce in zapolni 5'-lepljive konce. Nukleotidi za reakcijo pa so že dodani v reakcijskem pufru.

Pripravili smo 20 µl reakcijske mešanice pri čemer smo upoštevali, da mora biti optimalno molsko razmerje med vključkom in vektorjem 3:1. Če se razmerje dodatno prevesi v prid vključka, se namreč močno poveča tendenca vključevanja večih pomnožkov v en plazmid. Z bioinformacijskim orodjem Molar conversions (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA) smo preračunali, da potrebujemo 71,38 ng/µl vključka, upoštevajoč povprečno dolžino pomnožkov 16S rDNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23, oziroma 69,08 ng/µl vključka, nanašajoč na povprečno dolžino pomnožkov 16S rDNA *B. vulgatus* DSM 1447 ter *R. albus* 7. Denzitometrično izmerjenim koncentracijam produktov verižne reakcije s polimerazo (GENETOOLS, SynGene, VB) smo pripravili ustrezne redčine z vodo MQ.

Mešanico komponent reakcije »blunting« smo predhodno dobro premešali na vibracijskem mešalu ter jo med pripravo hranili na ledu. Ob pipetiranju smo uporabili ohlajene avtoklavirane nastavke za polavtomatske pipete. Mešanica reakcije »blunting« je vsebovala:

- 10 µl 2-kratnega reakcijskega pufra
- 4 µl skoncentriranega in očiščenega produkta verižne reakcije s polimerazo
- 3 µl vode brez nukleaz
- 1 µl DNA »blunting« encima

Mešanico smo premešali na vibracijskem mešalu in kratkotrajno centrifugirali (3 – 5 sekund, 10000 × g, sobna temperatura; angl. »short spin«; centrifuga Mini Spin Plus, Eppendorf, Nemčija). Po 5 minutni inkubaciji (termoblok CH-100, BIOSAN, Latvija) pri

70 °C smo reakcijsko mešanico hladili na ledu toliko časa, da se temperatura termostata termobloka ni spustila na 22 °C. Mešanici smo nato dodali:

- 1 µl vektorja pJET1.2/blunt (pJET1.2/blunt Cloning Vector; 50 ng/µl)
- 1 µl T4 DNA ligaze (5 U/µl)

Mešanico smo pazljivo premešali in vsebino mikrocentrifugirke zbrali s kratkotrajnim centrifugiranjem. Reakcija povezovanja je tekla 30 minut pri sobi temperaturi, čemur je sledila krajša inkubacija na ledu. Tako pripravljeno mešanico smo uporabili za transformacijo.

3.2.2.12.5 Transformacija

Pet µl mešanice reakcije »blunting« smo prenesli v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko ter jo hladili 2-minuti na ledu. Medtem smo 100 µl kompetentnih celic seva *E. coli* TOP10, predhodno pripravljenih s CaCl₂, odtajevali 5 minut na ledu. Z ohlajenimi nastavki za polavtomatsko pipeto smo dodali 50 µl kompetentnih celic 5 µl mešanice »blunting« reakcije in nežno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Po 20-minutah inkubacije na ledu je sledil 45 – 50 sekundni topotni šok pri 42 °C (termoblok CH-100, BIOSAN, Latvija) in 2 – 3 minutno hlajenje na ledu. Dodali smo 200 µl tekočega gojišča LB, ogretega do 37 °C, čemur je sledila 1-urna inkubacija s stresanjem (inkubatorski stesalnik Unitron Plus, isis, Irska) pri 37 °C in 175 vrtljajih/minuto. Na 37 °C ogrete agarske plošče LB_{Amp} smo z drigalski spatulo razmazali 100 µl bakterijske kulture transgenih celic, čemur je sledila inkubacija preko noči (12 – 16 ur) pri 37 °C. Pri selekciji rekombinantnih celic smo pazili, da smo plošče pregledovali prej kot po 16-urah inkubacije. Sčasoma namreč koncentracija ampicilina v koncentričnih conah okoli kolonij upade, kar po 16-urah omogoči rast celic brez rekombinantne DNA, ki tvorijo t.i. satelitske kolonije. Agarske plošče smo naslednji dan shranili pri 4 °C.

3.2.2.12.6 Izolacija plazmidne DNA

Uspešnost povezovanja plazmidnega vektorja z vključkom smo preverili z desetimi ponovitvami inokulacije naključno izbrane kolonije transgenih celic *E. coli* TOP10 v 1 ml tekočega gojišča LB_{Amp}. Po prekonočni inkubaciji (12 – 16 ur) v inkubatorskem sresalniku (Unitron Plus, isis, Irska) pri 37 °C in 250 vrtljajih/minuto smo kulturo centrifugirali (centrifuga Mikro 200R, Hettich Centrifuge, Velika Britanija) 3 minute pri 13000 × g in sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli v odlagalnik s tehničnim etanolom, iz celične usedline pa izolirali plazmidno DNA po navodilu proizvajalca kompleta »High Pure Plasmid Isolation Kit« (Roche Applied Science, Nemčija).

Izolacija plazmidne DNA s kompletom »High Pure Plasmid Isolation Kit« temelji na sprostitev plazmidne DNA iz bakterijskih celic z alkalno lizo. Kromosomska DNA ostane ujeta za necelovito celično steno, RNaza A v pufru za resuspendiranje usedka celic pa razgradi iz liziranih celic sproščeno RNA. Iz suspenzije so z nadaljnim centrifugiranjem precipitirani ostanki celic in kromosomska DNA. Filter iz steklenih vlaken v namenski centrifugirki pa omogoči selektivno vezavo plazmidne DNA v prisotnosti kaotropnih soli (gvanidin HCl). Vezano plazmidno DNA eluiramo s 50 µl pufra tris-HCl. Uspešnost transformacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, raztopino plazmidne DNA pa smo shranili pri -20 °C.

3.2.2.12.7 Cepitev izolirane plazmidne DNA

Krožno plazmidno DNA smo linearizirali z restriktijsko endonukleazo *XbaI* (Preglednica 32). S cepitvijo smo ugotoviti ali se je v rekombinantno celico vključil plazmid pJET1.2/blunt z vključkom ali brez njega.

Preglednica 32: Prepoznavno zaporedje restriktijske endonukleaze *XbaI*, mesto cepitve plazmida pJET1.2/blunt in tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi

Restriktijska endonukleaza	Prepoznavno zaporedje	Restriktijsko mesto [bp]	Tipi koncev, ki nastanejo po cepitvi
<i>XbaI</i>	5'-T ⁺ CTAGA-3'	377	lepljivi konci

Restriktijska mešanica je vsebovala:

- 8,5 µl izolirane plazmidne DNA (\approx 50 ng)
- 1 µl 1-kratnega pufra Buffer TangoTM (v 10-kratni končni koncentraciji; Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; 33 mM tris-acetat (pH 7,9 pri 37 °C), 66 mM kalijev acetat, 10 mM magnezijev acetat, 0,1 mg/ml BSA)
- 0,5 µl restriktijske endonukleaze *XbaI* (10 U/µl; Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA; encim shranjujemo v mešanici 10 mM tris-HCl (pH 7,4 pri 25 °C), 100 mM KCl, 7 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA in 50 vol. % glicerolu)

Mikrocentrifugirke so bile ves čas na ledu. Restriktijsko mešanico smo premešali, vsebino mikrocentrifugirke pa zbrali s kratkotrajnim centrifugiranjem (3 – 5 sekund, 10000 × g, sobna temperatura; angl. »short spin«; centrifuga Mini Spin Plus, Eppendorf, Nemčija). Mešanico smo inkubirali 2 uri v vodni kopeli pri 37 °C. Linearizacijo vektorja (Preglednica 33) smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 33: Dolžina lineariziranega plazmidnega vektorja pJET1.2/blunt z vključkom in brez njega

Vključen tarčni odsek 16S rDNA ^a	Dolžina cepljenega odseka DNA [bp]
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	4368
<i>P. ruminicola</i> 23	4370
<i>R. albus</i> 7	4343
Plazmidni vektor brez vključka	/
Plazmidni vektor z dvojnim vključkom	variacije ^b
	5764 ^c /5737 ^d

Oznake:

^a Pomnožki tarčnega odseka genov, ki kodirajo 16S rRNA pomnoženi s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) v verižni reakciji s polimerazo.

^b Dolžino lineariziranega plazmidnega vektorja z dvojnim vključkom smo izračunali upoštevajoč povprečno dolžino vseh variacij dvojnih vključkov.

^c Variacije vključkov tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23.

^d Variacije vključkov tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7.

3.2.2.12.8 Izbor kolonij transgenih celic za genske knjižnice

Iz vsake ponovitve povezovanja plazmidnega vektorja z vključkom smo naključno izbrali 96 kolonij transgenih celic. Jamice mikrotitrsko plošče (Cellstar[®], ZDA) smo v laminariju z multikanalno polavtomatsko pipeto napolnili s 150 µl gojišča LB_{Amp} za zamrzovanje sevov. Kolonije transgenih celic, zrasle na agarskih ploščah LB_{Amp}, smo s sterilnimi

zobotrebci prenesli v posamezne jamice. Mikrotitrski plošče smo po prekonoči inkubaciji (4 – 16 ur) s stresanjem (inkubatorski stresalnik Unitron Plus, isis, Irska) pri 120 vrtljajih/minuto in 37 °C, shranili pri -20 °C. Po odmrzovanju smo tekoče kulture transgenih celic precepili z avtoklaviranim in ožganim pripomočkom za precepljanje (jež) v mikrotitrski plošče napoljnene z 150 µl gojišča LB_{Amp} za zamrzovanje sevov, čemur je sledila prekonočna inkubacija.

3.2.2.12.9 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

3.2.2.12.9.1 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo

Vključkom, ki so povezani s plazmidnim vektorjem pJET1.2/blunt, smo ugotovili vrstno identiteto na podlagi njihovih dolžin pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (Preglednica 15).

Za kulture transgenih celic, katerih analiza z agarozno gelsko elektroforezo ni pokazala pomnožka tarčnega odseka gena, ki kodira 16S rRNA ali pa je bil le-ta neustrezne dolžine, smo ponovili verižno reakcijo s polimerazo, vendar tokrat s parom začetnih oligonukleotidov pJET1.2f/pJET1.2r. Slednja prilegata v bližini poliklonskega mesta, zaradi česar se pomnožuje polna dolžina vključka (Preglednica 17). Z agarozno gelsko elektroforezo smo ugotovili ali se je s plazmidnim vektorjem pJET1.2/blunt povezal vključek ali pa je ostal prazen oziroma rekombinantna celica sploh ni posedovala plazmida. Za kulture rekombinantnih celic, ki vsebujejo plazmid z vključkom, smo pomnoženi tarčni DNA ugotovili identiteto na podlagi dolžin odsekov DNA, cepljenih z restriktijsko endonukleazo.

3.2.2.12.9.2 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restrikcijo analizo

Vključkom, ki so povezani s plazmidom pJET1.2/blunt, smo ugotovili vrstno identiteto na podlagi restriktijskih profilov cepljenih produktov verižne reakcije s polimerazo (pomnoženi s parom začetnih oligonukleotidov pJET1.2f/pJET1.2r). Knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 smo analizirali z restriktijsko analizo cepitve z endonukleazo *AvaII* (pogl. 3.2.2.11.1), knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7 pa z endonukleazo *TaqI* (pogl. 3.2.2.11.2). Inkubacijo restriktijskih mešanic smo podaljšali na 4 ure, s čimer smo zagotovili učinkovitejšo restriktijsko fragmentacijo (Preglednica 34, Slika 7, Preglednica 35, Slika 8).

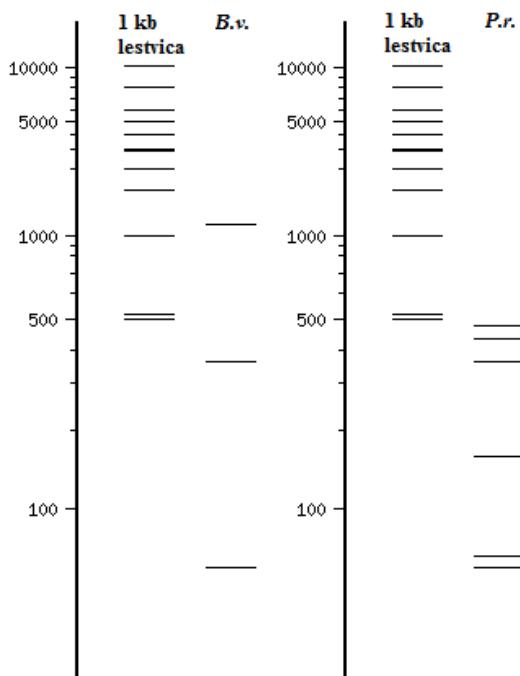
Preglednica 34: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo *AvaII*

Vrsta	Dolžina pomnožka [bp] ^a	Dolžine cepljenih odsekov DNA [bp] ^b
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	1513	365, 26, 1122
<i>P. ruminicola</i> 23	1515	365, 26, 164, 41, 480, 439

Oznaki:

^a Pomnožki tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženi s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr v verižni reakciji s polimerazo.

^b Podatki povzeti po *in silico* restrikcijski analizi z bioinformacijskim orodjem baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).



Slika 7: Analiza dolžin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**B.v.**) in *P. ruminicola* 23 (**P.r.**) cepljenih z endonukleazo *AvaII*

Oznaka:

ⁱ *In silico* elektroforezni geli z 1 ut. % deležem agaroze ter vnešenim umerjenim velikostnim standardom (1-kb lestvica) so povzeti iz baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).

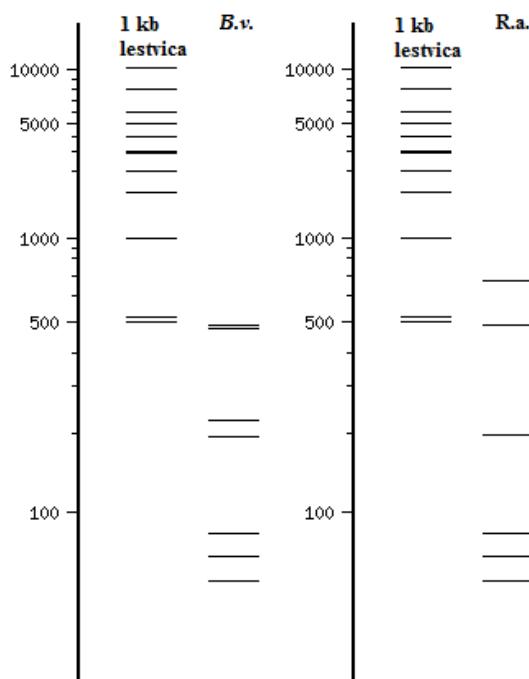
Preglednica 35: Dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA z endonukleazo *TaqI*

Vrsta	Dolžina pomnožka [bp] ^a	Dolžine cepljenih odsekov DNA [bp] ^b
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	1513	44, 73, 222, 479, 195, 489, 11
<i>R. albus</i> 7	1488	44, 73, 675, 198, 487, 11

Oznaki:

^a Pomnožki tarčnih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženi s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr v verižni reakciji s polimerazo.

^b Podatki povzeti po *in silico* restrikcijski analizi z bioinformacijskim orodjem baze NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).



Slika 8: Analiza dolžin odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**B.v.**) in *R. albus* 7 (**R.a.**) cepljenih z endonukleazo *TaqI*

Oznaka:

ⁱ *In silico* elektroforezni geli z 1 ut. % deležem agaroze ter vnešenim umerjenim velikostnim standardom (1-kb lestvica) so povzeti iz baze NEBCutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., ZDA).

3.2.2.13 Določanje zaporedja genov, ki kodirajo 16S rRNA in primerjalna analiza zaporedij vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedij v podatkovni bazi

3.2.2.13.1 Določanje zaporedij genov, ki kodirajo 16S rRNA

Pri določevanju nukleotidnega zaporedja vključkov plazmida pJET1.2/blunt smo kot matrico uporabili rekombinantno DNA. Na agarske plošče LB_{Amp} smo s cepilno zanko razmazali tekočo kulturo transgenih celic. Po prekonočni inkubaciji pri 37° smo kolonije postrgali in jih resuspendirali v 1 ml tekočega gojišča LB_{Amp}. Po 3 minutnem centrifugiranju (centrifuga Mikro 200R, Hettich Centrifuge, Velika Britanija) pri 13000 × g in sobni temperaturi smo supernatant odlili v odlagalnik s tehničnim etanolom, iz celične usedline pa izolirali plazmidno DNA (pogl. 3.2.2.12.6; vsaj v minimalni koncentraciji 0,1 mg/ml; spektrofotometer GeneQuant™ 1300, GE Healthcare, Velika Britanija) po navodilu proizvajalca (komplet »High Pure™ Plasmid Isolation Kit«, Roche Applied Science, Nemčija).

Analizirali smo štiri nukleotidna zaporedja vključkov (tarčni odsek gena, ki kodira 16S rRNA, pomnožen v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov fD1/RU1406, *B. vulgatus* DSM 1447 (iz obeh genskih knjižnic), *P. ruminicola* 23 in *R. albus* 7). Določanje nukleotidnega zaporedja so po naročilu izvedli v podjetju Microsynth

AG (Balgach, Švica). Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja je potekala enosmerno z začetnim oligonukleotidom RU1406, usmerjenim k začetku gena.

3.2.2.13.2 Primerjalna analiza zaporedij vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedij v podatkovni bazi

Nukleotidnim zaporedjem smo poiskali njim najbolj podobna zaporedja v podatkovni bazi GenBank (Benson in sod., 2010) z iskalnim algoritmom blast (Altschul in sod., 1990). Nukleotidna zaporedja smo vnesli v program BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine HGSC), jih preoblikovali v ustrezен format, shranili v tekstovno datoteko (.txt) ter jih s programom Reverse Complement (The Sequence Manipulation Suite) obrnili v njihov reverzni komplement zapisa. Nukleotidna zaporedja smo analizirali in primerjali (ClustalX 2.1 (Chenna in sod., 2003; Larkin in sod., 2007)) z njihovimi najbolj podobnimi zaporedij. Kromatograme nukleotidnih zaporedji smo pregledali s programskim orodjem FinchTV (Geospiza Inc., ZDA).

4 REZULTATI

4.1 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA ŠTEVILA GENOV, KI KODIRajo 16S rRNA

4.1.1 Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo prebavni trakt

Žnidaršič Bovhan L. Odraz števila operonov *rrn* v zastopanosti genov za 16S rRNA ... v genskih knjižicah.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2012

Preglednica 36: Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA in velikost kromosoma bakterijskih sevov iz debla *Bacteroidetes*

Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Dolžina kromosoma [Mb]	Viri	
							16S	23S	5S			
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	638R	7	5	7	5,37	Namavar in sod. (1989)	
						NCTC 9343	6	6	7	5,21		
						YCH46	6	6	7	5,28		
						<i>salanitronis</i>	DSM 18170	6	6	6	Gronow in sod. (2011)	
						<i>thetaiotaoamicron</i>	VP1-5482	5	5	5	6,26	
						<i>vulgaris</i>	ATCC 8482	7	7	7	5,16	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	ATCC 8503	7	7	7	4,81	Lathrop in sod. (2011)	
						TDC60	4	4	4	2,34		
						W83	4	4	4	2,34		
						<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>ruminicola</i>	23	4	4	3,62
						<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	<i>shahii</i>	WAL 8301	1	1	3,76
											Kulagina in sod. (2012)	

Preglednica 37: Število ribosomskih genov in velikost kromosoma bakterijskih sevov iz debla *Firmicutes*

Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Dolžina kromosoma [Mb]	Viri	
							16S	23S	5S			
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	LL3	6	6	6	4,00	Lee in sod. (2010)	
						TA208	6	6	6	3,94		
						XH7	7	7	7	3,94		
						<i>coagulans</i>	36D1	10	10	10	3,55	
						E681	12	12	12	5,39		
						<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	M1	10	10	5,87
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SC2	12	13	13	5,73	Svetoch in sod. (2005)	
						62	4	4	4	2,99		
						OG1RF	4	4	4	2,74		
						V583	4	4	4	3,22		
						<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	30SC	4	4	2,08
											Huycke in sod. (2002)	

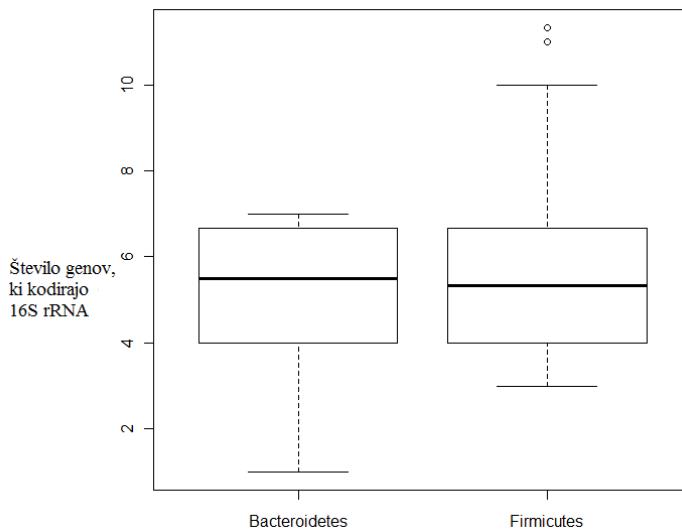
Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Dolžina kromosoma [Mb]	Viri
							16S	23S	5S		
Streptococcaceae	Streptococcus				<i>amylovorus</i>	NCFM	4	5	4	1,99	
						GRL 1112	4	4	4	2,07	Konstantinov in sod. (2004)
						GRL 1118	4	4	4	1,89	
					<i>brevis</i>	ATCC 367	5	5	5	2,29	Tannock (1999)
					<i>gasseri</i>	ATCC 33323	6	6	6	1,89	Tannock (1999)
					<i>reuteri</i>	DSM 20016	6	6	6	2,00	
						JCM 1112	6	6	6	2,04	Fabia in sod. (1993)
						SD2112	6	6	6	2,26	
					<i>rhamnosus</i>	ATCC 53103	5	5	5	3,01	
						GG	5	5	5	3,01	Weese in Anderson (2002)
						Lc 705	5	5	5	2,97	
					<i>salivarius</i>	CECT 5713	7	14	14	1,83	Tannock (1999)
Clostridiales					<i>gallolyticus</i>	UCN34	6	6	6	2,35	
						gallolyticus ATCC 43143	5	5	5	2,36	Osawa in Sasaki (2004)
						gallolyticus ATCC BAA-2069	7	7	7	2,36	
					<i>pasteurianus</i>	ATCC 43144	5	5	5	2,10	Lin in sod. (2011)
					<i>salivarius</i>	57.I	6	6	6	2,14	
						CCHSS3	5	5	5	2,22	Brooks in sod. (1974)
						JIM8777	6	6	6	2,21	
					<i>acetobutylicum</i>	ATCC 824	11	11	11	3,94	
						DSM 1731	11	11	11	3,94	Cato in sod. (1986)
						EA 2018	11	11	11	3,94	
					<i>limosum</i>	KIST612	5	5	6	4,32	Wang in sod. (1996)
					<i>elignes</i>	ATCC 27750	5	5	6	2,14	Lopez-Siles in sod. (2012)
					<i>rectale</i>	ATCC 33656	5	5	5	3,45	Wilson in Blitchington (1996)

Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Dolžina kromosoma [Mb]	Viri	
							16S	23S	5S			
			<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>proteoclasticus</i>	B316	4^a	4^a	4^a	3,55 ^a	Li in sod. (2012)	
				<i>Roseburia</i>	<i>hominis</i>	A2-183	2^b	2^b	2^b	0,30 ^b		
			<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>orientis</i>	DSM 765	4	4	4	3,59	Falony in sod. (2009)
					<i>acetoxidans</i>	DSM 771	9	9	9	5,86	Zinkevich in Beech (2000)	
					<i>carboxydivorans</i>	CO-1-SRB	10	11	9	4,55	Gibson in sod. (1990)	
					<i>kuznetsovii</i>	DSM 6115	8	8	8	2,89	Pado in Pawłowska-Cwiek (2005)	
					<i>ruminis</i>	DSM 2154	3	3	3	3,60	Duan ins sod. (2011)	
			<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>albus</i>	7	4	4	4	3,69	Kopečný in sod. (2004)	
			<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>fermentans</i>	DSM 20731	6	6	6	2,33	Smith in sod. (2003)	
<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>		<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	DSM 2008	4	4	4	2,13	Benno in sod. (1984)	

Oznaki:

^a Kromosom.

^b Kromid.

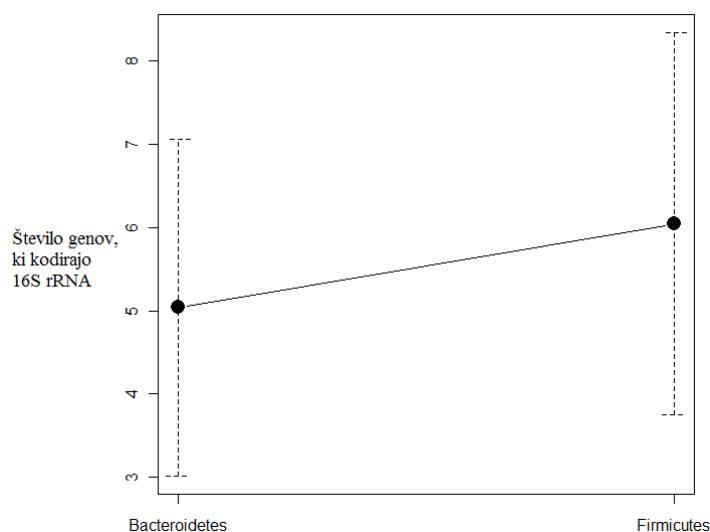


Slika 9: Okvir z ročaji za število genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo prebavni trakt, glede na bakterijski debli

Oznaka:

ⁱDiagram je izrisan s programom R Commander R 2.13.0 GNU (General Public License).

Iz Slike 9 lahko razberemo, da je srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA za obe bakterijski debli skoraj enaka ($Me_{Bacteroidetes} = 5,5$; $Me_{Firmicutes} = 5,4$). Četrtina analiziranih bakterijskih vrst iz obeh debel ima manj kot 4 gene, ki kodirajo 16S rRNA, četrtina vrst pa več kot 6,7. Le celokupnen nabor števila genov, ki kodirajo 16S rRNA variira med debloma. Pri vrstah iz debla *Bacteroidetes* v genomih najdemo od 1 do 7 operonov *rrn*, pri *Firmicutes* pa od 3 do 12. Pri tem velja posebej opomniti, da smo vrstam z raznolikim številom genov, ki kodirajo 16S rRNA med sevi pripisali izračunano povprečno vrednost. S tem smo se izognili podvajanju podatkov števila genov RNA male ribosomske podenote vseh sevov in posledično napačni porazdelitvi. Zanimala nas namreč ni porazdelitev števila genov, ki kodirajo 16S rRNA v nukleotidnih zbirkah, temveč kako in/ali variira število genov RNA male ribosomske podenote med vrstami in/ali višjimi taksonomskimi enotami.

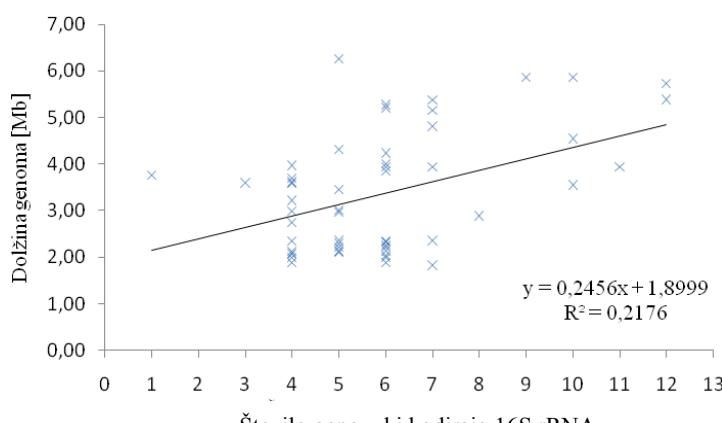


Slika 10: Diagram povprečij števila genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo prebavni trakt, glede na bakterijski debli

Oznaka:

ⁱ Standardni odklon = 0,95. ⁱⁱ Diagram je izrisan s programom R Commander R 2.13.0 GNU (General Public License).

Povprečno število genov, ki kodirajo 16S rRNA se med bakterijskima debloma razlikuje. Pri vrstah iz debla *Bacteroidetes* le-ta znaša $5,0 \pm 2,0$ ter pri *Firmicutes* $6,0 \pm 2,3$ (Slika 10).



Slika 11: Razsevni grafikon dolžine genoma in števila genov, ki kodirajo 16S rRNA

Oznaki:

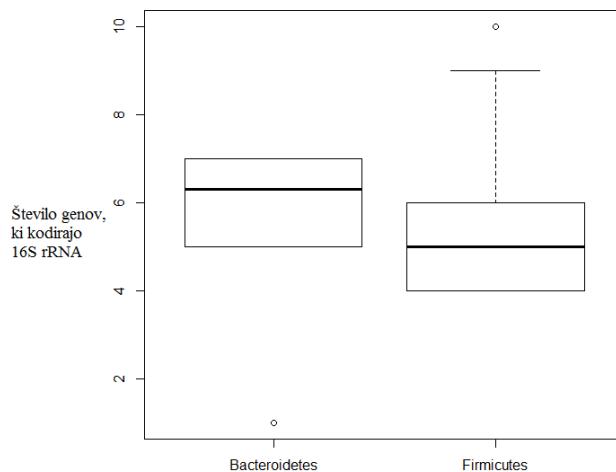
ⁱ V analizi je zajet ves nabor podatkov ($N = 57$ genomov) neopredeljujoč na taksonomsko deblo.

ⁱⁱ Dolžina genoma in število genov, ki kodirajo 16S rRNA *Butyrivibrio proteoclasticus* B316 je seštevek kromosomske in kromidne informacije.

Z naraščajočo dolžino genoma je korelacija s številom genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA zanemarljivo majhna (Slika 11).

4.1.2 Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo debelo črevo

Želeli smo tudi ugotoviti ali se porazdelitev števila genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA razlikuje med naborom uporabne genomske informacije vseh bakterijskih sevov, ki poseljujejo prebavni trakt živali in človeka, v primerjavi s sevi v debelem črevesu.

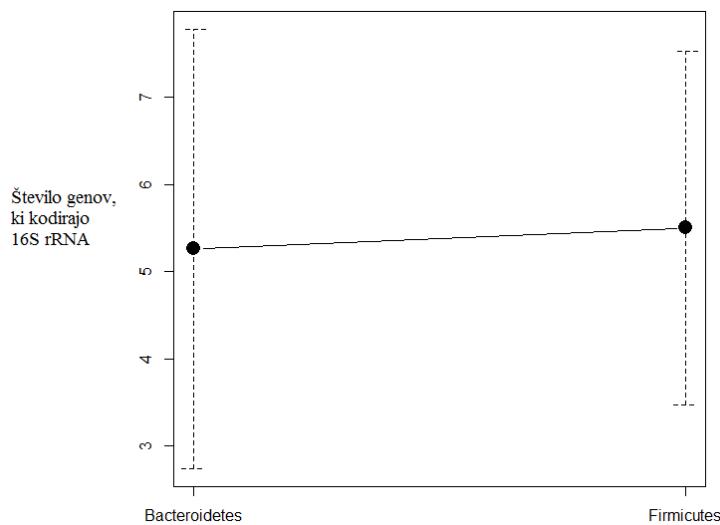


Slika 12: Okvir z ročaji za število genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo debelo črevo, glede na bakterijski debli

Oznaki:

ⁱ Diagram je izrisan s programom R Commander R 2.13.0 GNU (General Public License). ⁱⁱ Nabor podatkov je v Prilogi F.

Iz Slike 12 lahko razberemo, da je srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA za obe bakterijski debli podobna ($Me_{Bacteroidetes} = 6,3$; $Me_{Firmicutes} = 5$). Polovica analiziranih bakterijskih vrst iz debla *Bacteroidetes* ima manj kot 6,3 genov, ki kodirajo 16S rRNA, polovica pa več. V deblu *Firmicutes* je mediana nekoliko nižja – 5 genov, ki kodirajo 16S rRNA. Četrtnina vrst iz slednjega debla ima več kot 6 genov male ribosomske podenote. Najmanjše število genov, ki kodirajo 16S rRNA je pri deblu *Bacteroidetes* 1 (spodnji osamelec), pri *Firmicutes* pa 4. Tudi celokupnen nabor števila genov, ki kodirajo 16S rRNA med debloma variira. Pri vrstah iz debla *Bacteroidetes* v genomih najdemo od 1 do 7 operonov *rrn*, pri *Firmicutes* pa od 4 do 10. Pri tem velja posebej opomniti, da smo vrstam z raznolikim številom genov, ki kodirajo 16S rRNA med sevi pripisali izračunano povprečno vrednost. S tem smo se izognili podvajanju podatkov števila genov RNA male ribosomske podenote vseh sevov in posledično napačni porazdelitvi.



Slika 13: Diagram povprečij števila genov, ki kodirajo 16S rRNA sevov, ki poseljujejo debelo črevo, glede na bakterijski debli

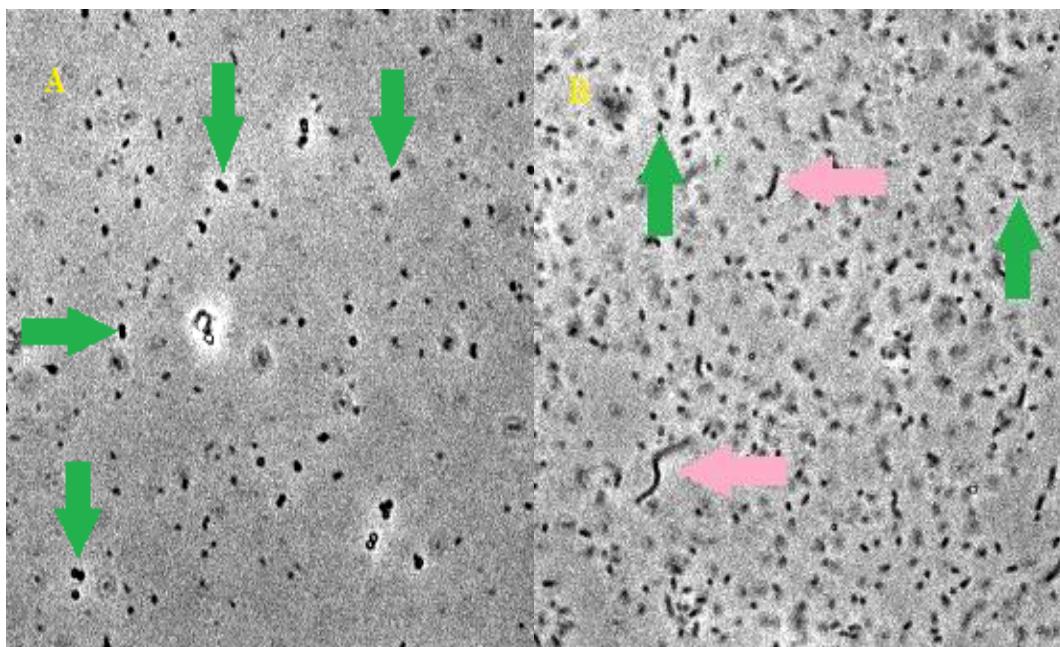
Oznake:

ⁱ Standardni odklon = 0,95. ⁱⁱ Diagram je izrisan s programom R Commander R 2.13.0 GNU (General Public License). ⁱⁱⁱ Nabor podatkov je v Prilogi F.

Povprečno število genov, ki kodirajo 16S rRNA, se med bakterijskima debloma razlikuje. Pri vrstah iz debla *Bacteroidetes* le-ta znaša $5,3 \pm 2,5$ ter pri *Firmicutes* $5,5 \pm 2,0$ (Slika 13).

4.2 ANALIZA ZASTOPANOSTI GENOV, KI KODIRajo 16S rRNA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH VRST V GENSKIH KNJIŽNICAH

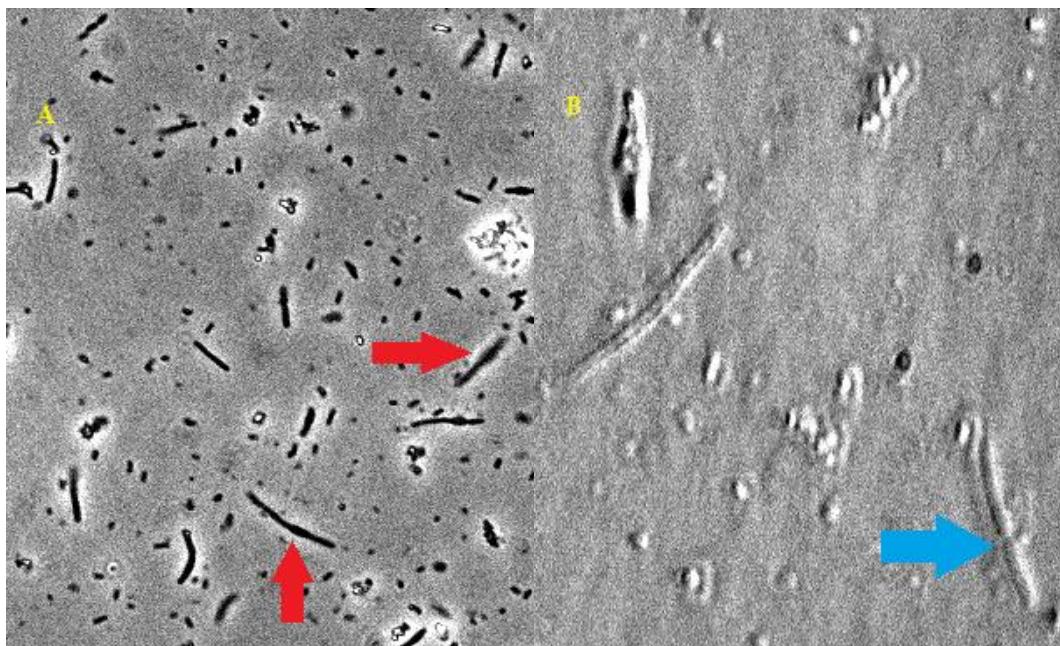
4.2.1 Mikroskopiranje nativnih preparatov



Slika 14: Nativni preparat *R. albus* 7 (A) in *P. ruminicola* 23 (B)

Oznaki:

ⁱ 400-kratna povečava fazno kontrastnega mikroskopa (BX50 F3, Olympus, Japonska). ⁱⁱ Zelene puščice so usmerjene v nekatere diplokoke, rožnati v palčki.

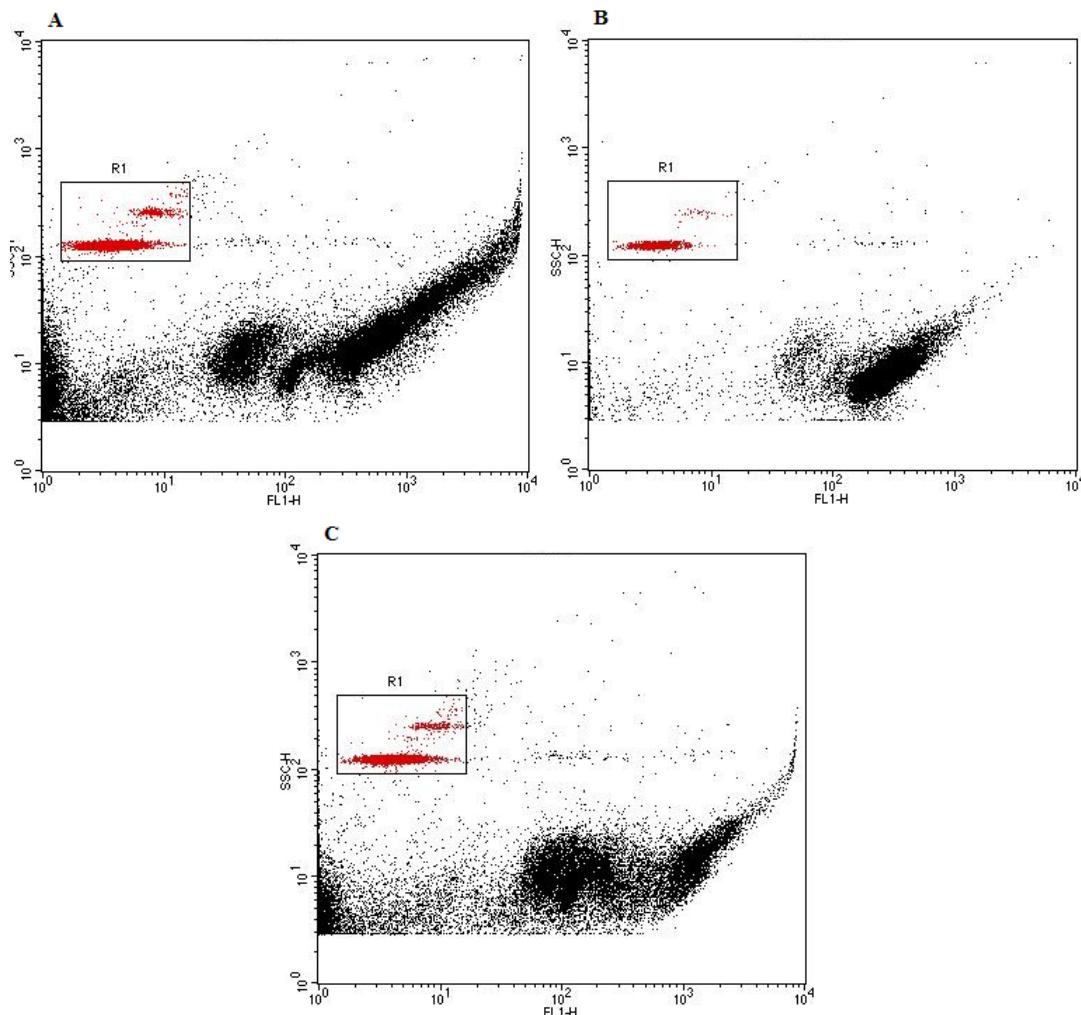


Slika 15: Nativni preparat *B. vulgatus* DSM 1447

Oznaki:

ⁱ 400-kratna povečava (A) in 1000-kratna povečava (B) fazno kontrastnega mikroskopa (BX50 F3, Olympus, Japonska). ⁱⁱ Rdeči puščici sta usmerjeni v celično zadebelitev, modra v povezavo dveh daljših palčk.

4.2.2 Analiza meritev števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom



Slika 16: Dvodimenzionalni točkovni grafikon meritev števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom
 Oznake:

A: 2000-kratno redčenje vzorca celic *B. vulgaris* DSM 1447.

B: 2000-kratno redčenje vzorca celic *P. ruminicola* 23.

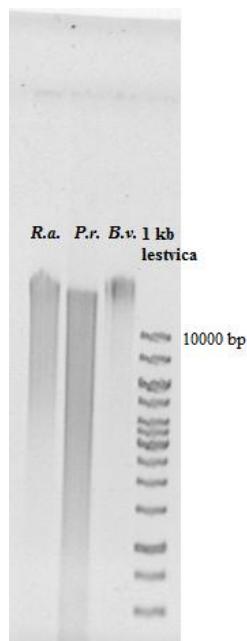
C: 10000-kratno redčenje vzorca celic *R. albus* 7.

R1: Regija kroglic.

Na dvodimenzionalnih točkovnih grafikih stranskega odboja v odvisnosti od zelene fluorescence smo ločili regijo celic in regijo kroglic. Na vseh grafikih sta vidni dve različni, ločeni celični populaciji. Izkazalo se je, da je levi »oblak« dogodkov v grobem predstavljal samostojne celice, desni »oblak« dogodkov pa daljše palčke, verižice in podobne skupke celic. Te nazorno dokazujo dolgi »repi«, ki dodatno potrjujejo rezultate mikroskopiranja.

V poskusu smo nameravili združiti alikvota bakterijskih kultur v končnem deležu celic 1:1. Ker pa s pretočno citmetrijo nismo mogli natančno ovrednotiti števila bakterijskih celic (razprava v pogl. 5.1.2.1) smo morali poiskati drugačen pristop, kako zagotoviti enak delež genomske DNA vsake vrste. Izolirano kromosomsko DNA iz kultur izbranih bakterijskih vrst smo zato ustrezno redčili tako, da so posamezni alikvoti vsebovali enako število kromosomov vsake vrste.

4.2.3 Izolirana kromosomska DNA



Slika 17: Elektroforezna ločitev izolirane kromosomske DNA *B. vulgaris* DSM 1447 (**B.v.**), *P. ruminicola* 23 (**P.r.**) in *R. albus* 7 (**R.a.**)

Oznaki:

ⁱ Ob desnem robu slike je dopisana velikost proge umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1-kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ⁱⁱ 0,7 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Izolacija kromosomske DNA iz vseh treh bakterijskih kultur je bila uspešna (Slika 17).

4.2.4 Merjenje koncentracije izolirane kromosomske DNA

Preglednica 38: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije izolirane kromosomske DNA

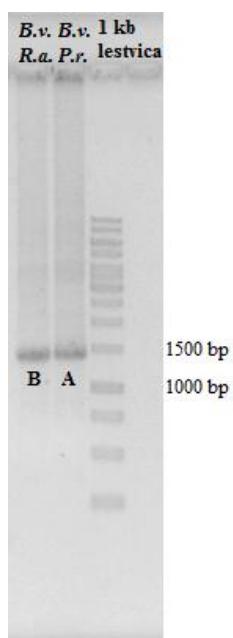
Vrsta	A ₃₂₀	A ₂₆₀ ^a	A ₂₈₀ ^a	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentracija kromosomske DNA [ng/µl]
<i>B. vulgaris</i> DSM 1447	0,049	0,017	0,009	1,889	24,8
<i>P. ruminicola</i> 23	0,019	0,080	0,043	1,860	116,0
<i>R. albus</i> 7	0,081	0,047	0,027	1,741	66,1

Opomba:

^a Podanim vrednostim absorbance pri svetlobi valovne dolžine 260 nm in 280 nm je že odšteta meritev absorbance pri svetlobi valovne dolžine 320 nm.

Iz izračunanega razmerja A₂₆₀/A₂₈₀ (Preglednica 38), uporabljenega kot kvalitativno merilo za čistost DNA, utemeljimo ustrezeno stopnjo čistosti raztopine DNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23. V raztopini DNA *R. albus* 7 pa so, sodeč po nižjem razmerju absorbanc, prisotni ostanki fenola in/ali beljakovin – kljub temu odstopanju, je bila kvaliteta in kvantiteta izolirane kromosomske DNA vseh vrst sprejemljiva.

4.2.5 Analiza uspešnosti pomnoževanja genov, ki kodirajo 16S rRNA iz osamljene kromosomske DNA



Slika 18: Analiza uspešnosti pomnoževanja genov, ki kodirajo 16S rRNA v verižni reakciji s polimerazo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406) iz osamljene kromosomske DNA
Oznake:

A: Povprečen pomnožek genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**B.v.**) in *P. ruminicola* 23 (**P.r.**) v dolžini 1395 bp.

B: Povprečen pomnožek genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**B.v.**) in *R. albus* 7 (**R.a.**) v dolžini 1382 bp.

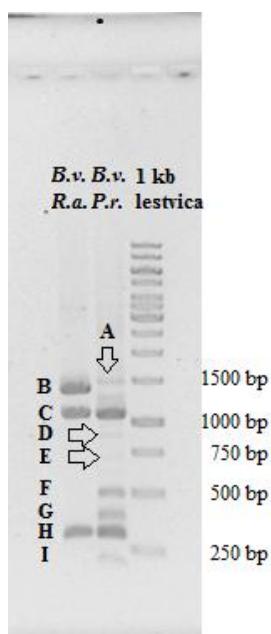
ⁱ Ob desnem robu slike sta dopisani velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1-kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ⁱⁱ 0,8 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Tarčne odseke genov, ki kodirajo 16S rRNA smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma (fD1/RU1406). Z omenjenim parom smo uspešno namnožili pomnožek (Slika 18) ustrezajoč dolžini *in silico* analize (Preglednica 14), s čimer smo potrdili prisotnost genov, ki kodirajo 16S rRNA v ekvimolarni raztopini molekul DNA dveh bakterijskih vrst.

4.2.6 Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA

Z analizo dolžin cepljenih odsekov DNA smo potrdili identiteto bakterijskih vrst, ovrgli možnost kontaminacije ter dokazali uspešnost pomnoževanja produktov verižne reakcije s polimerazo.

4.2.6.1 Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA cepljenih z restriktijsko endonukleazo *AvaII*



Slika 19: Elektroforezna slika delne cepitve pomnože 16S ribosomske DNA z restriktijsko endonukleazo *AvaII*

Oznake:

A: Necepljeni pomnožki 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 1394 bp in *P. ruminicola* 23 dolžine 1396 bp.

B: Necepljeni pomnožki 16S rRNA *R. albus* 7 dolžine 1369 bp in deloma *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 1394 bp.

C: Cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 1065 bp (desno in levo).

D: Nepopolno cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *P. ruminicola* 23 skupne dolžine 903 bp (seštevek odsekov DNA dolžine 41 bp, 480 bp in 382 bp).

E: Nepopolno cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *P. ruminicola* 23 skupne dolžine 711 bp (seštevek odsekov DNA dolžine 26 bp, 164 bp, 41 bp in 480 bp).

F: Cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *P. ruminicola* 23 dolžine 480 bp.

G: Cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *P. ruminicola* 23 dolžine 382 bp.

H: Cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 (desno in levo) in *P. ruminicola* 23 (desno) dolžine 303 bp.

I: Nepopolno cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *P. ruminicola* 23 skupne dolžine 231 bp (seštevek odsekov DNA dolžine 26 bp, 164 bp in 41 bp).

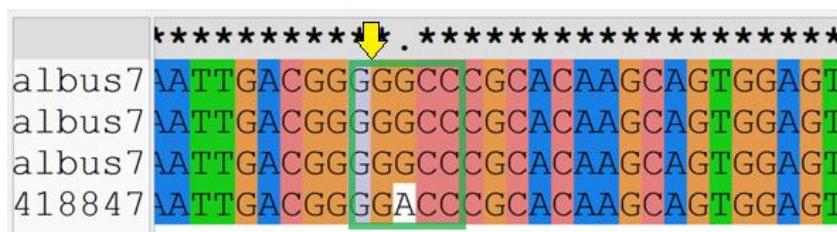
ⁱ Restriktijski profil genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406). ⁱⁱ Navedene dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati, prikazanimi v Preglednici 29 in Sliki 5. ⁱⁱⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ^{iv} 0,9 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Cepitev pomnožene ribosomske DNA z endonukleazo *AvaII* rezultira identiteto *B. vulgatus* DSM 1447 z odseki dolžine 1065 bp (C, Slika 19). Lega krajših cepljenih odsekov dolžine 303 bp (H, Slika 19), orientirajoč se na progo umerjenega velikostnega standarda dolžine 250 bp, pa je prav tako ustrezna. Omenjeni cepljeni odseki DNA se pozicijsko razvrstijo identično v obeh vnosih vzorcev.

Delna cepitev pomnožkov 16S rDNA *P. ruminicola* 23 je vendarle omogočila sprejemljivo razlikovanje identitet. Šibka barvna intenziteta elektroforeznih prog necepljenih odsekov dolžine 903 bp (D, Slika 19) in 711 bp (E, Slika 19) opozarja na nepopolno cepitev, ki bi jo lahko omilili z daljšim časom inkubacije. Sledijo restriktijski odseki dolžine 480 bp (F, Slika 19), 382 bp (G, Slika 19) in 303 bp (H, Slika 19), ki pozicionalno ovrednotijo identiteto vrste. Kljub delni cepitvi lahko trdimo, da je cepljena DNA odsek pomnožkov genov, ki kodirajo 16S rRNA *P. ruminicola* 23.

Restriktijske odseke 16S rDNA dolžine 303 bp (H, Slika 19) imata tako *B. vulgatus* DSM 1447 kot *P. ruminicola* 23, saj se prepoznavno nukleotidno zaporedje endonukleaze *AvaII*, nahaja v njunih visoko ohranjenih prekrivajočih se regijah.

Pomnožene odseke genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 restriktijska endonukleaza *AvaII* ni cepila. Elektroforezna proga (B, Slika 19) je ustrezala celoviti dolžini produktov verižne reakcije s polimerazo. Ker je bila *in silico* analiza (Preglednica 29, Slika 5) opravljena le z enim naključno izbranim genom, ki kodira 16S ribosomske RNA, je šele poravnava (Slika 20) vseh štirih genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 z bioinformacijskim orodjem ClustalX 2.1 (Chenna in sod., 2003; Larkin in sod., 2007) razkrila, da ima le eden izmed njih restriktijsko mesto cepitve z *AvaII*. Temu tako je tri četrtine pomnožkov 16S rDNA ostalo necepljenih, število odsekov DNA cepljene četrtine pa nezadostno za nastanek vidne elektroforetske proge. Zatorej smo cepitev ponovili z endonukleazo *TaqI*.



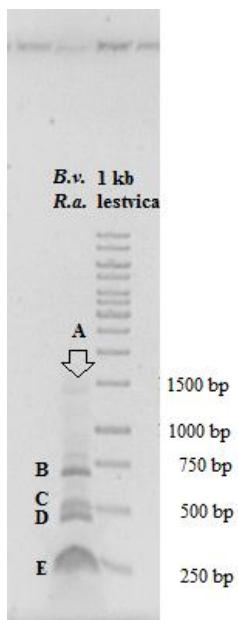
Slika 20: Prepoznavno nukleotidno zaporedje restriktijske endonukleaze *AvaII* (5'-GGWCC-3')

Oznaki:

i Mesto cepitve (ponazarja rumena puščica) med 894 in 895-nukleotidom v verižni reakciji s polimerazo pomnožene 16S ribosomske DNA *R. albus* 7 najdemo le v enem operonu *rrn*.

ii Degenerirano nukleotidno mesto W označuje dušikovo bazo adenin ali timin.

4.2.6.2 Restriktijska analiza pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, cepljenih z restriktijsko endonukleazo *TaqI*



Slika 21: Elektroforezna slika delne cepitve pomnožene 16S rDNA z restriktijsko endonukleazo *TaqI*
Oznake:

- A: Necepljeni pomnožki 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 1394 bp in *R. albus* 7 dolžine 1369 bp.
- B: Nepopolno cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *R. albus* 7 skupne dolžine 730 bp (seštevek odsekov DNA dolžine 55 bp in 675 bp).
- C: Cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 479 bp.
- D: Elektroforezno neločeni cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 443 bp in *R. albus* 7 dolžine 441 bp.
- E: Elektroforezno neločeni cepljeni odseki pomnožene 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 222 bp in 195 bp ter *R. albus* 7 dolžine 198 bp.

ⁱ Restriktijski profil genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (fD1/RU1406). ⁱⁱ Navedene dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA, se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati, prikazanimi v Preglednici 31 in Sliki 6. ⁱⁱⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1-kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ^{iv} 0,9 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza. ^v Ukrivljene elektroforezne proge so posledica nekompatibilne ionske jakosti pufra NEBuffer 4 (NEW ENGLAND BioLabs, Velika Britanija) in standarda GeneRuler™ 1-kb DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA).

Restriktijska analiza cepitve z endonukleazo *TaqI* tokrat le pogojno potrjuje identiteto vrste *R. albus* 7 z necepljenimi odseki DNA skupne dolžine 730 bp (B, Slika 21). Elektroforezna lega proge z dolžino 479 bp (C, Slika 21) je postavljena previsoko, glede na progo umerjenega velikostnega standarda dolžine 500 bp. Vendar predpostavljam, da gre za odseke DNA *B. vulgaris* DSM 1447. Sledijo elektroforezno neločeni cepljeni odseki 16S rDNA *B. vulgaris* DSM 1447 dolžine 443 bp in *R. albus* 7 dolžine 441 bp (D, Slika 21). Lega zadnje proge (E, Slika 21) pa predstavlja skupek elektroforezno neločenih cepljenih odsekov 16S rDNA dolžine 222 bp in 195 bp *B. vulgaris* DSM 1447 ter *R. albus* 7 v dolžini 198 bp.

4.2.7 Pozitivna kontrolna transformacija

Število transgenih celic je neposredno odvisno od učinkovitosti transformacije kompetentnih celic. Iz 100 µl 5-krat redčene suspenzije kompetentnih celic seva *E. coli* TOP10 z dodanimi 150 ng krožne, dodatno zvite plazmidne DNA (DNA pRH3) smo pričakovali na plošči selekcijskega gojišča LB_{Amp} približno 1000 bakterijskih kolonij in učinkovitost transformacije 1×10^6 transgenih celic/µg DNA.

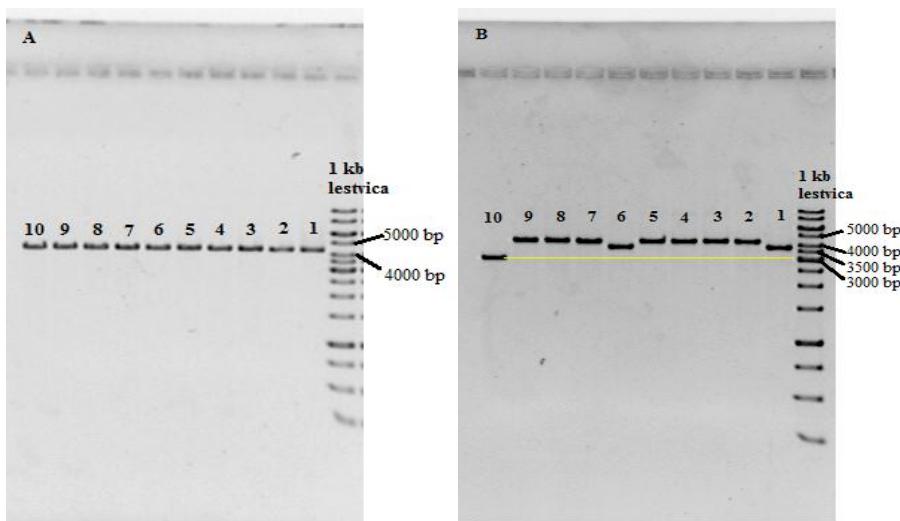
Preglednica 39: Rast transgenih celic na selekcijskem gojišču LB_{Amp}

Redčitev transformacijske mešanice	Rast
1/50	konfluentna
1/500	8.8×10^5 CFU/ml
negativna kontrola: 1/50	ni rasti

Izračunali smo, da so kompetentne celice seva *E. coli* TOP10 dosegle učinkovitost transformacije 5.8×10^6 transgenih celic/µg dodatno zvite plazmidne pRH3 DNA. Rezultati (Preglednica 39) potrdijo uspešnost transformacije.

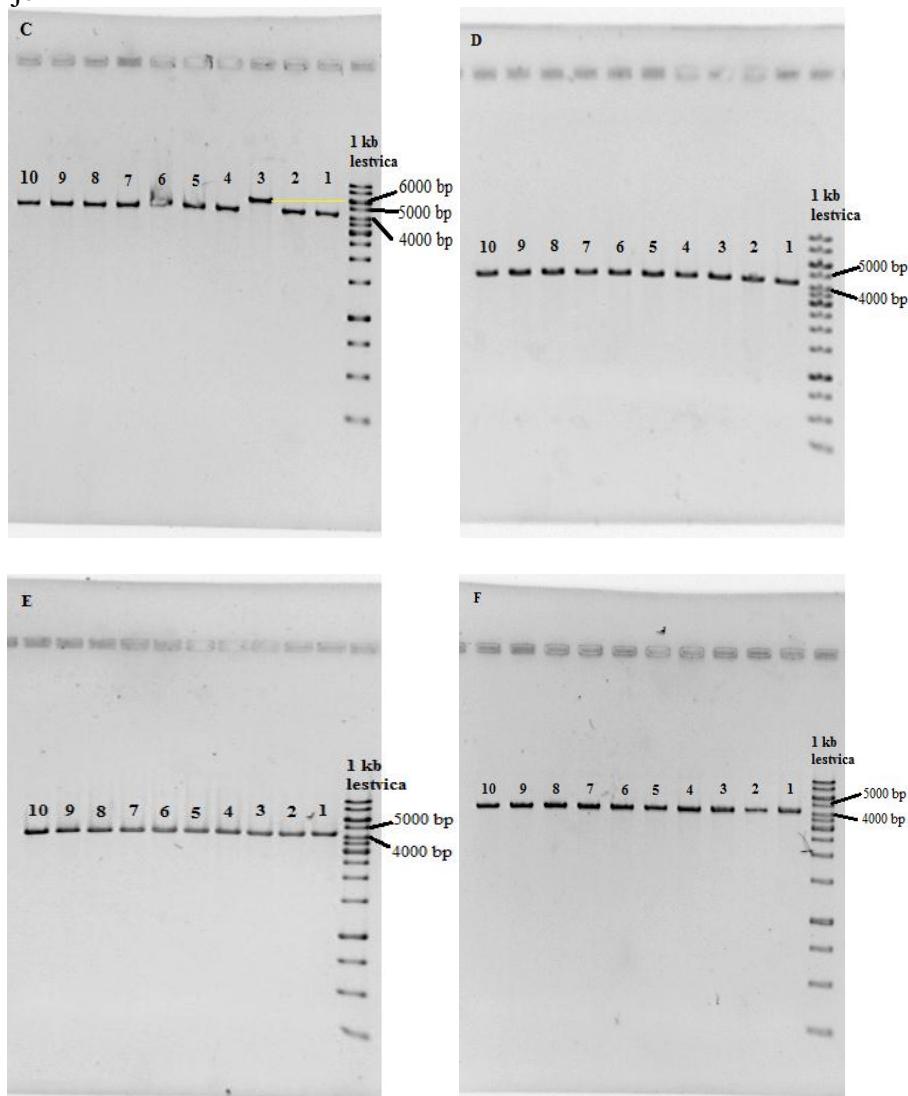
4.2.8 Restriktijska analiza rekombinantne DNA, cepljene z restriktijsko endonukleazo *XbaI*

Z analizo dolžin cepljene rekombinantne DNA smo ugotovili ali se je s plazmidom pJET1.2/blunt povezal vključek ustrezne dolžine (Slika 22). S plazmidnim vektorjem se je lahko povezal vključek polne dolžine pomnožka, nepopolen odsek, dvojni vključek ali pa je le-ta ostal brez njega. Plazmid smo linearizirali z restriktijsko endonukleazo *XbaI*.



Slika 22: Analiza cepitve rekombinantne DNA, cepljene z restriktijsko endonukleazo *XbaI*
se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 22: Analiza cepitve rekombinantne DNA, cepljene z restriktivno endonukleazo *Xba*I

Oznake:

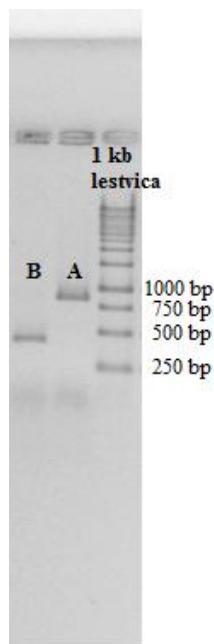
- A:** 1. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23. Vse naključno izbrane kolonije transgenih celic imajo plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**1 – 10**).
- B:** 2. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23. Sedem naključno izbranih kolonij transgenih celic ima plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**2, 3, 4, 5, 7, 8, 9**). Prva in šesta izbrana kolonija imata s plazmidom povezan nepopoln odsek DNA. Vektor zadnje, desete kolonije, pa je prazen (2974 bp; rumena premica nadzornejše prikazuje velikost linearizirane rekombinantne DNA).
- C:** 3. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23. Devet naključno izbranih kolonij transgenih celic ima plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10**). Tretja kolonija pa ima z vektorjem povezana dvojna vključka (rumena premica nadzornejše prikazuje velikost linearizirane rekombinantne DNA).
- D:** 1. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7. Vse naključno izbrane kolonije transgenih celic imajo plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**1 – 10**).
- E:** 2. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7. Vse naključno izbrane kolonije transgenih celic imajo plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**1 – 10**).
- F:** 3. ponovitev knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7. Vse naključno izbrane kolonije transgenih celic imajo plazmid z vključkom ustrezne velikosti (**1 – 10**).

ⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ⁱⁱ Navedene dolžine linealizirane rekombinantne DNA se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati, prikazanimi v Preglednici 33. ⁱⁱⁱ 0,7 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza. ^{iv} Ker je vsak gel neponovljiv, se tudi hitrost potovanja vzorcev med geli razlikuje.

S kontrolnim poskusom, ki ga je izvedel proizvajalec komercialno dostopnega kompleta »CloneJET™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA) naj bi, po njihovih zagotovilih, več kot 90 % rekombinantnih plazmidov pJET1.2/blunt vsebovalo vključek primerne dolžine (Fermentas, 2011). Ker je bil delež vključkov ustreznih dolžin v vseh ponovitvah sprejemljiv, smo nadaljevali z izdelavo genskih knjižnic.

4.2.9 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

4.2.9.1 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo



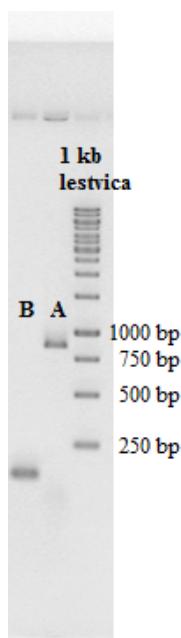
Slika 23: Analiza dolžin očiščenih pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA (*B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23) pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s pari ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov

Oznaki:

A: Pomnožki genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA *B. vulgatus* DSM 1447 (dolžine 846 bp), pomnoženi v verižni reakciji s polimerazo s parom ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov BvulF/BvulR.

B: Pomnožki genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA *P. ruminicola* 23 (dolžine 466 bp), pomnoženi v verižni reakciji s polimerazo s parom ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov PrumF/PrumR.

ⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1-kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ⁱⁱ Navedene dolžine pomnožkov genov, ki kodirajo 16S rRNA se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati prikazanimi v Preglednici 15. ⁱⁱⁱ 1,2 ut. % agarozni gel, 30 minutna elektroforeza.



Slika 24: Analiza dolžin očiščenih pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA (*B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7), pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s pari ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov

Oznaki:

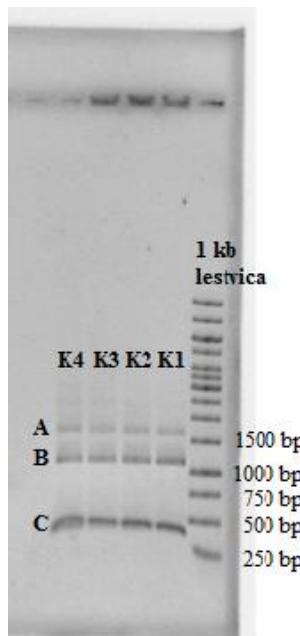
A: Pomnožki genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA *B. vulgatus* DSM 1447 (dolžine 846 bp), pomnoženi v verižni reakciji s polimerazo s parom ozko specifičnih začetnih oligonukleotidov BvulF/BvulR.

B: Pomnožki genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA *R. albus* 7 (dolžine 124 bp), pomnoženi v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov RalbF/RU1406.

ⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ⁱⁱ Navedene dolžine pomnožkov genov, ki kodirajo 16S rRNA se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati prikazanimi v Preglednici 15. ⁱⁱⁱ 0,9 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

V verižni reakciji s polimerazo smo upešno pomnožili tarčne odseke rekombinantne DNA, ki so ustrezali *in silico* analizi (Preglednica 15). Dolžine produktov so nam omogočale jasno ugotavljanje in ločevanje identitete pomnoženih genov, ki kodirajo 16S rRNA (Slika 23, 24).

4.2.9.2 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restrikcijsko analizo



Slika 25: Elektroforezna slika delne cepitve očiščenih pomnoženih genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA *B. vulgatus* DSM 1447 z restrikcijsko endonukleazo *AvaII*

Oznake:

K1 – K4: Ponovitve cepitve pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA. Vsaki ponovitvi je bila predhodno ugotovljena identiteta gena, ki kodira 16S rRNA z analizo dolžin pomnožkov verižne reakcije s polimerazo, ki smo jo nato dodatno potrdili z zgornjo restrikcijsko analizo.

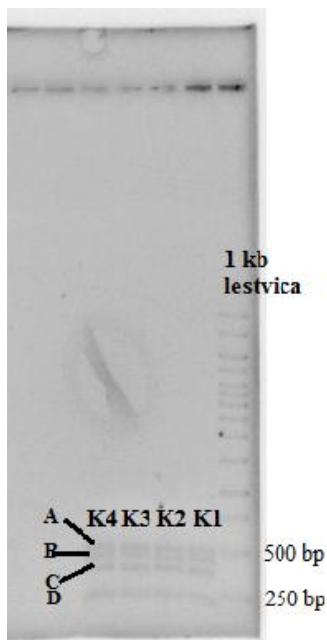
A: Necepljeni pomnožki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 1513 bp.

B: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 1122 bp.

C: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 365 bp.

ⁱ Restrikcijski profil genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr. ⁱⁱ Navedene dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA, se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati, prikazanimi v Preglednici 34 in Slika 7. ⁱⁱⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ^{iv} 0,7 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Elektroforezna lega prog odsekov DNA, cepljenih z restriktazo *AvaII*, dolžin 1122 bp (B, Slika 25) in 365 bp (C, Slika 25), potrjuje identiteto *B. vulgatus* DSM 1447 oprijemajoč se na *in silico* restrikcijsko analizo (Slika 9) in primerljive rezultate restrikcijske analize pomnožkov verižne reakcije s polimerazo, pomnoženih s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (Slika 19).



Slika 26: Elektroforezna slika cepitve pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA *P. ruminicola* 23 z restrikcijsko endonukleazo *AvaII*

Oznake:

K1 – K4: Ponovitve cepitve pomnožkov genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA. Vsaki ponovitvi je bila predhodno ugotovljena identiteta gena, ki kodira 16S rRNA z analizo dolžin pomnožkov verižne reakcije s polimerazo, ki smo jo nato dodatno potrdili z zgornjo restrikcijsko analizo.

A: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 480 bp.

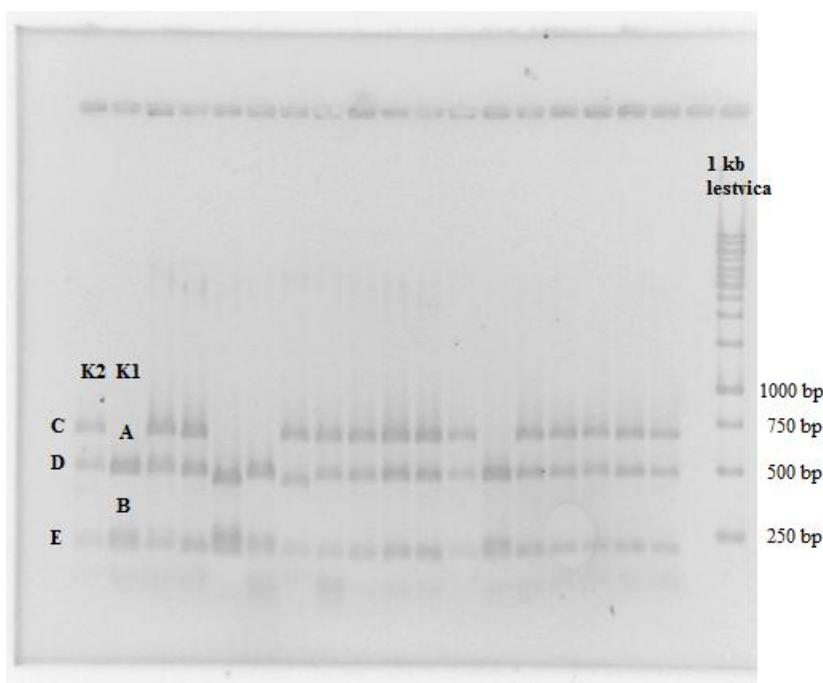
B: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 439 bp.

C: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA dolžine 365 bp.

D: Necepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA skupne dolžine 231 bp (seštevek odsekov DNA dolžine 26 bp, 164 bp in 41 bp).

ⁱ Restrikcijski profil genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr. ⁱⁱ Navedene dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA, se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati prikazanimi v Preglednici 34 in Slika 7. ⁱⁱⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ^{iv} 0,7 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Restrikcijska analiza cepitve pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S rRNA, z endonukleazo *AvaII*, odražajo identiteto *P. ruminicola* 23 kljub rahlo previsoki legi proge dolžine 480 bp (A, Slika 26) glede na progo umerjenega velikostnega standarda dolžine 500 bp. Sledijo cepljeni odseki DNA dolžine 439 bp (B, Slika 26) in 365 bp (C, Slika 26), ki pozicionalno potrjujejo identiteto vrste. Necepljene odseke DNA s skupno dolžino 231 bp (D, Slika 26) pa najdemo tudi pri cepitvi pomnožene ribosomske DNA s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (I, Slika 19). Lega cepljenih odsekov DNA se torej sklada z *in silico* rezultati (Slika 9) in restrikcijsko analizo cepljenih genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA, pomnoženih s parom začetnih oligonukleotidov fD1/RU1046 (Slika 19).



Slika 27: Elektroforezna slika delne cepitve pomnoženih odsekov genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA *B. vulgatus* DSM 1447 (**K1**) in *R. albus* 7 (**K2**) z restriktijsko endonukleazo *TaqI*

Oznake:

A: Elektroforezno neločeni odseki pomnoženih genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 dolžine 479 bp in 489 bp.

B: Elektroforezno neločeni odseki pomnoženih genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 dolžine 222 bp in 195 bp.

C: Necepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 skupne dolžine 748 bp (seštevek cepljenih odsekov DNA dolžine 73 bp in 675 bp).

D: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 dolžine 487 bp.

E: Cepljeni odseki genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 dolžine 198 bp.

ⁱ Restriktijski profil genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr. ⁱⁱ Navedene dolžine odsekov cepljenih genov, ki kodirajo 16S rRNA se nanašajo na *in silico* analizo z rezultati, prikazanimi v Preglednici 35 in Slika 8.ⁱⁱⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda (1-kb lestvica – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). ^{iv} 0,7 ut. % agarozni gel, 1-urna elektroforeza.

Restriktijska analiza profila cepitve z endonukleazo *TaqI* (Slika 27) je kljub podobnim produktom cepitve med *B. vulgatus* DSM 1447 (K1, Slika 27) in *R. albus* 7 (K2, Slika 27) omogočila razločevanje identitet, glede na cepljen odsek DNA *R. albus* 7 dolžine 748 bp (C, Slika 27). Le-ta je sicer necepljen odsek dolžin 73 bp in 675 bp, ki pa se (B, Slika 19; sicer krajši, saj se kot tarča ne pomnožuje tudi del plazmide DNA v okolini poliklonskega mesta) pojavi tudi pri cepitvi genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA pomnoženih s parom začetnih oligonukleotiov fD1/RU1046. S primerljivimi produkti cepitve obeh analiz tako ovržemo možne indice teoretičnih produktov (na primer skupni seštevek dolžine 701 bp iz odsekov DNA *B. vulgatus* DSM 1447 dolgih 222 bp in 479 bp) in potrdimo verodostojnost identitete še pred določanjem nukleotidnega zaporedja. Žal pa so zaradi prepoznavnih nukleotidnih zaporedij encima, ki se nahajajo v visoko ohranjenih prekrivajočih se regijah obeh vrst, dolžine ostalih cepljenih odsekov DNA zelo podobne ali pa se ti še niso ločili v razmaknjeni elektroforezni progi, kar nam onemogoča še dodatno preverbo. Tako odseki DNA *R. albus* 7 dolžine 487 bp sovpadajo z elektroforezno

neločenimi razrezki *B. vulgatus* DSM 1447 dolžine 479 bp in 489 bp. Podobno težavo imamo tudi s pozicionalno neločenimi odseki DNA *B. vulgatus* DSM 1447 dolžine 222 bp in 195 bp in odseki DNA *R. albus* 7 dolžine 198 bp.

4.2.10 Razmerje genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

4.2.10.1 Knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23

Preglednica 40: Število genov, ki kodirajo 16S rRNA v treh ponovitvah genskih knjižnic (*B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23)

Identiteta gena, ki kodira 16S rRNA	Ponovitev			Povprečje
	1.	2.	3.	
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	54	73	65	64
<i>P. ruminicola</i> 23	32	15	19	22
prazen vektor	6	1	9	3,3
nepopoln fragment	4	7	9	6,7
Suma	96	96	96	/

Preglednica 41: Razmerje števila operonov *rrn* *B. vulgatus* DSM 1447 : *P. ruminicola* 23 v treh ponovitvah genskih knjižnic

<i>In silico</i>	Ponovitev			Standardni odklon
	1.	2.	3.	
7:4	6,8:4	19,6:4	13,6:4	13,2:4
	7:4,1	7:1,4	7:2,1	7:2,1
1,75×	1,7×	4,9×	3,4×	3,3×
				1,3×

4.2.10.1 Knjižnice genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7

Preglednica 42: Število genov, ki kodirajo 16S rRNA v treh ponovitvah genskih knjižnic (*B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7)

Ponovitev

Identiteta gena, ki kodira 16S rRNA	1.	2.	3.	Povprečje
<i>B. vulgatus</i> DSM 1447	3	4	5	4
<i>R. albus</i> 7	90	84	91	88,4
prazen vektor	2	4	0	2
nepopoln fragment	1	4	0	1,7
Suma	96	96	96	/

Preglednica 43: Razmerje števila operonov *rrn* *B. vulgatus* DSM 1447 : *R. albus* 7 v treh ponovitvah genskih knjižnic

Ponovitev				
In silico	1.	2.	3.	Povprečje
7:4	0,1:4	0,2:4	0,2:4	0,2:4
	7:210,0	7:147,0	7:127,4	7:161,7
1,75 ^x	30,0 ^x	21,0 ^x	18,2 ^x	23,1 ^x
				5,0 ^x

4.2.11 Primerjalna analiza določenih nukleotidnih zaporedji vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedji v podatkovni bazi

Vključkom plazmidnih vektorjev rekombinantnih celic iz genskih knjižnic smo na podlagi dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo in dolžin cepljenih odsekov DNA z restrikcijsko endonukleazo ugotovili vrstno identiteto. Štirim vključkom (Preglednica 44), za katere smo ugotovili identiteto, smo določili nukleotidno zaporedje in jih primerjali z najbolj podobnim zaporedjem v podatkovni bazi GenBank (Benson in sod., 2010), s čimer smo potrdili pravo identiteto vključkov rekombinantnih plazmidov.

Preglednica 44: Najbolj podobna zaporedja v podatkovni bazi nukleotidnih zaporedji po analizi iskalnega algoritma

Knjižnica	Zaporedje	Najbolj podobno zaporedje ^c	Številka kromosoma GenBank ^c	Pokritost [%]	Podobnost [%]
i^a	a	<i>Bacteroides vulgatus</i> DSM 1447 ^T	CP000139.1	100	99
	b	<i>Prevotella ruminicola</i> Bryant 23 ^T	CP002403.1	100	99
ii^b	c	<i>Bacteroides vulgatus</i> DSM 1447 ^T	CP000139.1	99	92
	d	<i>Ruminococcus albus</i> 7 ^T	CP002006.1	98	99

Oznake:

^a Knjižnica genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 (prva ponovitev).

^b Knjižnica genov, ki kodirajo 16S rRNA *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7 (prva ponovitev).

^c Najbolj podobno zaporedje v bazi nukleotidnih zaporedji GenBank (Benson in sod., 2010) po analizi z iskalnim algoritem blast (Altschul in sod., 1990).

Kromatogrami nukleotidnih zaporedji, pregledani s programskim orodjem FinchTV (Geospiza Inc., ZDA), so bili čitljivi v vseh primerih.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Bioinformacijska analiza števila genov, ki kodirajo 16S rRNA

Nabor zanesljive informacije o številu genov, ki kodirajo 16S rRNA je bil po končani analizi (december 2011) izredno skop. Izbrali in temeljito pregledali smo 8 vrst (od tega 11 sevov) iz bakterijskega debla *Bacteroidetes* in 28 vrst (od tega 47 sevov) iz debla *Firmicutes*. Že na tem mestu je potrebno posebno poudariti, da je vzorec izrazito premajhen za kakršnokoli objektivno sklepanje o splošnem številu ribosomskih operonov v proučevanih bakterijskih deblih ali njunih nižjih taksonomskih enotah. Razglabljamo lahko le o analiziranih vrstah/sevih. Sklepanje o številu operonov *rrn* sorodnih taksonov pa bi moralo biti zelo pazljivo, predvsem pa je žal še preuranjeno.

Ilustrativen grafičen prikaz podatkov številske spremenljivke (Slika 9, Slika 12) prikazuje srednjo vrednost števila genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA izbranih bakterijskih vrst iz obeh debel zelo podobno (prebavni trakt: $Me_{Bacteroidetes} = 5,5$; $Me_{Firmicutes} = 5,4$; debelo črevo: $Me_{Bacteroidetes} = 6,3$; $Me_{Firmicutes} = 5$). Bakterije, ki živijo v prebavnem traktu živali in človeka, tako ne sovpadajo s trditvijo Acinas-ove in sod. (2004), da ima 40 % proučevanih organizmov le 1 ali 2 operona *rrn* in vendar je opazen manjši negativen odmik od povprečnih 7 ribosomskih operonov (Slika 10, Slika 13). Število genov, ki kodirajo 16S rRNA je znotraj in med debloma raznoliko. Pri *Bacteroidetes* najdemo od 1 do 7 kopij, pri *Firmicutes* od 3 do 12. Med dolžino genoma in številom genov, ki kodirajo 16S rRNA je korelacija zanemarljivo majhna (Slika 11). Kljub manjšemu vzorcu je regresijska analiza primerljiva rezultatom študije Fogel-a in sod. (1999).

Želeli smo tudi ugotoviti ali se porazdelitev števila genov, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA razlikuje med analizo uporabne genomske informacije bakterijskih sevov, ki poslujujo prebavni trakt živali in človeka v primerjavi s sevi v debelem črevesu. Ugotovili smo, da se razporeditev med različno zajetimi podatki ne razlikuje bistveno. Srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S rRNA je med proučevanima okoljskima skalama primerljiva. Analiza je torej pokazala, da ne le debelo črevo, temveč celoten prebavni trakt naseljujejo bakterije s širokim spektrom števila operonov *rrn*, z opazno tendenco večjega števila ribosomskih operonov.

Kot so v svoji študiji dokazali Fogel in sod. (1999) ter Acinas-ova in sod. (2004) smo tudi mi našli razlike v številu operonov *rrn* znotraj vrst in potrdili, da pojav nikakor ni omejen na specifično filogenetsko skupino. Različno število genov, ki kodirajo 16S rRNA smo našli pri sevih *Bacteroides fragilis* (6 ali 7), *Bacillus amyloliquefaciens* (6 ali 7), *Paenibacillus polymyxa* (10 ali 12), *Streptococcus galloyticus* (5 do 7) in *Streptococcus salivarius* (5 ali 6), zato je potrebna izredna pazljivost in tehten premislek, kakšno število genov, ki kodirajo 16S rRNA, pripisemo takim vrstam (v naši analizi smo uporabili povprečno vrednost). Izjemo pripisujemo tudi *Butyrivibrio proteoclasticus* B316. Njegov 4,4 Mb dolg genom ima štiri replikone: dva mega plazmida, kromosom z zapisom za 4

operone *rrn* (3,55 Mb) in kromid z zapisom za 2 operona *rrn* (0,30 Mb) – najmanjši bakterijski kromid in prvi identificiran v deblu *Firmicutes* (Kelly in sod., 2010).

Ribosomski geni v transkripcijski enoti niso bili vedno razvrščeni zaporedoma v smeri 5'-16S-23S-5S-3'. Našli smo neskladja v številu genov, ki kodirajo 16S ter 23S in/ali 5S rRNA pri vseh treh sevih *Bacteroides fragilis*, *Paenibacillus polymyxa* SC2, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 in *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771. Dodatne kopije genov, ki kodirajo 23S in/ali 5S rRNA so lahko dodane k transkripcijski enoti 5'-16S-23S-5S-3' ali pa jih najdemo samostojno in neodvisno od prepisa gena, ki kodira 16S rRNA. Še več, kljub navidezno enakemu številu genov RNA male in velike ribosomske podenote, šele natančna analiza razkrije, da so nekateri geni RNA velike ribosomske podenote dodani, nadalje v genomu pa izvzeti iz transkripcijskih enot operonov *rrn*. Tako le seštevek ribosomskih genov (npr. *Desulfotomaculum carboxydovorans* CO-1-SRB) včasih napačno prikazuje sosledje le-teh v transkripcijskih enotah. Pojem operona *rrn* v pričajočem diplomskem delu in raziskavah s podobno tematiko proučevanja se tako izključno nanaša na število genov, ki kodirajo 16S rRNA, ne glede na raznoliko število genov RNA velike ali male ribosomske podenote.

Temeljita *in silico* analiza genomov je razkrila mnoge dvome o verodostojnosti objavljenih podatkov v skupini popolno obdelanih genomov (angl. »complete genomes«) v nukleotidni zbirkki GenBank (Benson in sod., 2010). V genomu seva *Bacillus coagulans* 2-6 (sev je izvzet iz skupnih rezultatov) najdemo zapis gena, ki kodira 16S in 23S rRNA, ki nista del skupne transkripcijske enote, ter devet genov, ki kodirajo 5S rRNA. Primerjajoč s številom ribosomskih genov seva 36D1, ki nosi zapis za 10 operonov *rrn*, le težko verjamemo v pravilno kategorizacijo takšnega genomskega zaporedja. Kot smo in so dokazali, najdemo razlike v številu operonov *rrn* znotraj vrste, vendar tako drastičnega razkoraka ni moč sprejeti. Zatorej velja opozorilo pregleda genomov vseh sevov vrste, saj le tako lahko vrsti pripisemo pravilno število ribosomskih genov.

Podobne težave smo imeli tudi s skupino deloma obdelanih genomov (angl. »genomes in progress«) v nukleotidni zbirkki GenBank (Benson in sod., 2010). Pred začetkom bioinformacijske analize smo predvidevali, da bomo manjši nabor vrst s poznamo celotno dednino razširili s skupino deloma obdelanih bakterijskih genomov. Vendar se je izkazalo, da so takšni genomi za analize števila operonov *rrn* praktično neuporabni. Manjkajoči odseki so preveliki (večji od dolžine gena, ki kodira 16S rRNA), odseki zaporedij pa bi se nemara lahko prekrivali med seboj, zaradi česar bi bilo število operonov *rrn* celo precenjeno. Razkorak števila genov, ki kodirajo 16S rRNA med popolno in deloma obdelanimi genomi sevov istih vrst pa je bil nesprejemljiv. Prav zato smo morali našo analizo omejiti le na seve z objavljenim celotnim zaporedjem genoma.

5.1.2 Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

5.1.2.1 Analiza meritev s pretočnim citometrom in mikroskopskih preparatov

Pred začetkom eksperimentalnega poskusa smo predvidevali, da nam morfološke oblike posameznih vrst omogočajo natančno ovrednotenje števila bakterijskih celic s pretočno citometrijo. V začrtovanem poskusu smo nameravali združiti alikvota bakterijskih kultur v končnem deležu celic 1:1. Vendar je ideja propadla z neuporabnimi in nepričakovanimi rezultati pretočne citometrije in mikroskopije.

V dvodimenzionalnih točkovnih grafikonih meritev števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom (Slika 16) je močan šum in drugi nerazložljivi dogodki v ozadju, tesno združeni z bakterijsko populacijo, onemogočal prepričljive rezultate. Del šuma smo sicer odpravili s filtracijo pufra PBS v steklovino, ki je bila med avtoklaviranjem napolnjena z deionizirano in mikrofiltrirano vodo. Večino šuma pa smo pripisali nespranim ostankom delcev enkratno centrifugiranega vampnega soka v gojišču M2. S centrifugiranjem in/ali filtriranjem bi odpravili večino neželenega šuma in vendar ne bi poustvarili drugačnih rastnih pogojev kot sicer. Celična usedlina, rastlinski delci in eksudati v enkratno centrifugiranem vampnem soku so nam tudi pri mikroskopiranju nativnih preparatov oteževali jasno ločevanje med bakterijskimi celicami in ostanki delcev ter motili meritve optične gostote. Zaradi primerljivih velikosti in raznolikosti celic ter delcev bi bila tudi ocena števila bakterijskih celic s Petroff-Hauser-jevo števno komoro napačna. Ponovljivost meritev s pretočnim citometrom je bila prav tako nezadovoljiva. Vsak vzorec bakterijske kulture smo nameravali 2-krat analizirati z vmesnim mešanjem na vibracijskem mešalu, s čimer bi zagotovili homogenost vzorca, vendar meritve pred in po mešanju so se razlikovale tudi do 20 %.

Presenetila nas je predvsem pleomorfna celična morfologija *B. vulgatus* DSM 1447 (Slika 15) po prekonočni inkubaciji, ko naj bi le-ta že prešel v stacionarno fazo rasti. Pod mikroskopom smo opazovali krajše in daljše palčke, verižice ter zadebelitve celičnega telesa. To anomalijo nazorno prikazuje dolg »rep« v dvodimenzionalnem točkovnem grafikonu (A, Slika 16). Tudi število celic vrst *R. albus* 7 in *P. ruminicola* 23, zaradi nastajanja diplokokov in povezovanja v krajše verižice (Slika 14), ni moč izmeriti. Vrednotenje meritev števila bakterijskih celic nam torej otežujejo neenakomerna dolžina palčk, verižice in podobni skupki. Take gruče detektor pretočnega citometra opiše kot en dogodek (eno celico) posledično pa postanejo rezultati neverodostojni in zavajajoči. Prav zato je vzorce priporočljivo pred analizo s pretočnim citometrom na hitro pregledati s svetlobnim mikroskopom, da ocenimo prisotnost celičnih skupkov, ki bi se jih lahko znebili s filtracijo skozi posebne filtre. Skupke verižic in diplokokov bi sicer lahko razdrli tudi s sonifikatorjem, vendar ne moremo zagotoviti, da bi ločili prav vse. Zaradi razbitja celic bi izgubili še del populacije, metodo pa bi morali vrstno optimizirati. Temu tako je bilo potrebno poiskati drugačen pristop kako zagotoviti enak delež genomske DNA vsake vrste.

5.1.2.2 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

V raztopini z ekvimolarnim deležem matrične kromosomske DNA izbranih bakterijskih vrst smo v verižni reakciji s polimerazo pomnožili gene, ki kodirajo 16S ribosomsko RNA, jih povezali s plazmidnim vektorjem pJET1.2/blunt, rekombinantno DNA pa s transformacijo vnesli v umetno kompetentne celice *E. coli* TOP10. Izdelali smo tri genske knjižnice transgenih celic. Vključkom rekombinantnega plazmidnega vektorja smo ugotovili identiteto na podlagi dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo. Za vzorce, kjer se tarčna DNA v specifični verižni reakciji ni pomnoževala, pa smo ovrgli lažno negativne rezultate s pomnoževanjem polne dolžine vključka. Njihovo identiteto smo ugotovili z restriktionskimi profili.

5.1.2.2.1 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z analizo dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo

Vključkom, ki so povezani s plazmidnim vektorjem, iz knjižnic transgenih celic smo ugotovili identiteto na podlagi dolžin njihovih pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (Preglednica 17, Slika 23, Slika 24). Za kulture transgenih celic (v jamicah mikrotitrskih plošč), kjer se tarčna 16S rDNA ni pomnoževala ali pa so bili pomnožki neustrezne dolžine, smo ponovili reakcijo, vendar tokrat s parom začetnih oligonukleotidov pJET1.2f/pJET1.2r. Na podlagi dolžin produktov smo ugotovili, ali se je z vektorjem povezal vključek ali pa je ostal prazen oziroma rekombinantna celica sploh ni posedovala plazmida.

Pogost problem pomnoževanja tarčne DNA v verižni reakciji s polimerazo lahko odseva slabo kakovost nukleinskih kislin, zaradi mnogokratnega odtajevanja in zamrzovanja vzorcev ali kontaminacije z nespecifičnimi endonukleazami DNA. Seveda obstaja tudi možnost, da DNA v vzorcih sploh ni bilo oziroma je število molekul tarčnih nukleinskih kislin pod mejo zaznavanja z verižno reakcijo s polimerazo. Predvsem pa je pomnoževanje tarčnih odsekov DNA direktno iz suspenzije celic manj učinkovito (lažno negativni rezultati) kot iz osamljene nukleinske kisline. Specifičnost reakcije pomnoževanja s polimerazo narašča z višanjem temperature, s specifičnostjo hibridizacije začetnih oligonukleotidov s tarčno DNA in z nižanjem koncentracije MgCl₂, zato smo protokol optimizirali upoštevajoč gradient temperature, koncentracij MgCl₂, dNTP-jev ter matrične DNA. Vendar razlik med uspešnostjo pomnoževanja tarčnih odsekov DNA različnih bakterijskih vrst ni bilo.

Za pomnoževanje 16S rDNA *R. albus* 7 smo uporabili kar začetni oligonukleotid RU1406, ki smo ga prvotno uporabljali za pomnoževanje daljšega odseka 16S rDNA iz vzorcev osamljene kromosomske DNA. S parom začetnih oligonukleotidov (RalbF/RU1406) smo uspešno pomnožili gene, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7, katerih dolžina je omogočala vrstno razlikovanje identitet. Slabost izbranega oligonukleotidnega para pa je žal relativno kratka dolžina pomnoženih zaporedji (B, Slika 24) in s tem posledično nazanesljiva primerjalna analiza. Kljub temu je sekvečna analiza potrdila pravo identiteto 16S rDNA, s čimer lahko trdimo, da je kljub negotovi dolžini pomnožka rezultirano število genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah verodostojno.

5.1.2.2.2 Ugotavljanje identitete genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah z restriktionsko analizo

Vključkom rekombinantnega plazmidnega vektorja knjižnic transgenih celic, pomnoženim v verižni reakciji s polimerazo s parom začetnih oligonukleotidov pJETf/pJETr, smo ugotovili identitet na podlagi njihovih restriktionskih profilov endonukleaze *AvaII* (genska knjižnica *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23) (Slika 25, Slika 26) ali *TaqI* (genska knjižnica *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7) (Slika 27). Kljub podobnim produktom cepitve med bakterijskimi vrstami in/ali le deloma cepljenimi odseki DNA so nam zadovoljivi rezultati omogočili zanesljivo razločevanje identitet genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA. Za celovitejšo restriktionsko analizo se zato nismo odločili.

5.1.2.3 Primerjalna analiza določenih nukleotidnih zaporedji vključkov plazmidnih vektorjev z najbolj podobnimi zaporedji v podatkovni bazi

Z določevanjem nukleotidnega zaporedja smo dokazali pravo identiteto vključkov rekombinantnih plazmidov, ki smo jih izolirali iz izbranih kultur transgenih celic iz genskih knjižnic. Zaporedjem smo poiskali njim najpodobnejša zaporedja v nukleotidni zbirkici GenBank (Benson in sod., 2010). Za iskanje smo uporabili algoritem blast (Altschul in sod., 1990), ki deluje po načelu iskanja lokalnih podobnosti. Pri izračunu upošteva le primerjane odseke zaporedji, večjih vrzeli, ki so posledica delecij ali insercij nukleotidov, in odsekov večjega neujemanja pa ne upošteva. Pri vseh štirih zaporedjih je primerjava z algoritmom pokazala, da gre za gene, ki kodirajo 16S rRNA izbranih sevov (Preglednica 44).

Pregled kromatograma zaporedja d (gen, ki kodira 16S rRNA *R. albus* 7; Preglednica 44 in Priloga D) pa bi lahko ponujal manjše dvome. Določena je bila krajše zaporedje, neberljivega konca pa proizvajalec ni dodal. Zato bi bilo potrebno ponoviti reakcijo določevanja nukleotidnega zaporedja z začetnim oligonukleotidom RalbF, ki je usmerjen k koncu gena.

5.1.2.4 Analiza zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah

V pričujočem diplomskem delu smo želeli ugotoviti ali se število operonov *rrn* odraža v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah. Bakterijske seve smo izbrali na podlagi njihovega števila genov RNA male ribosomske podenote in filogenetske sorodnosti med njimi (Preglednica 12).

Navedeni rezultati napovedujejo večja odstopanja kot smo jih teoretično pričakovali. Zastopanost genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 v genskih knjižnicah (Preglednica 40, 41) je ustrezajoče (7:2,1). Razmerje v prvi ponovitvi knjižnic transgenih celic (7:4,1) se je skoraj idealno približalo teoretičnemu izračunu (7:4). Zanimivo, da sta drugi dve paralelki, ki sta bili sočasno izdelani isti dan, močneje odstopali (7:1,4 in 7:2,1) od pričakovanj in prve ponovitve, kar je posledica razsoja pri povezovanju vključka s plazmidnim vektorjem.

Kljub temu lahko s tremi ponovitvami knjižnic rekombinantnih celic s posedajočimi plazmidnimi vektorji, ki so povezani s pomnožki genov, ki kodirajo 16S ribosomske RNA vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23, potrdimo pričakovano hipotezo, da se razmerje števila operonov *rrn* izbranih bakterijskih vrst odraža v genskih knjižnicah. A kljub ustreznemu zastopstvu genov, ki kodirajo 16S rRNA je še prenagljeno trditi, da bi se trend izkazoval v genskih knjižnicah kateregakoli para bakterijskih vrst. To neizpodbitno pokažemo z zastopanostjo genov, ki kodirajo 16S rRNA vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7 (Preglednica 42,43). Odstopanje v prid genov RNA male ribosomske podenote *R. albus* 7 je bilo namreč izredno visoko (7:161,7).

Zakaj je prišlo do prevlade genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7 lahko le teoretično domnevamo. **(i)** Uspešnost povezovanja vključka z vektorjem nam je zagotavljal komplet »CloneJET™ PCR Cloning Kit« (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki naj bi, po zagotovilu proizvajalca, z 90 % učinkovitostjo spojil tarčno DNA s plazmidnim vektorjem pJET1.2/blunt. To je bil edini korak med izdelavo genskih knjižnic, ki je bil za vsako ponovitev samostojen in bi se morebitna napaka jasno izkazovala v le eni seriji. Temu ni bilo tako, zato smo odstopanje v zastopanosti genov RNA male ribosomske podenote *R. albus* 7 v knjižnicah transgenih celic povezali s selektivnim spajanjem vključka z vektorjem. Zakaj so se preferenčno vključevali vključki DNA *R. albus* 7, kljub nižji koncentraciji in podobni dolžini kot vključki DNA *B. vulgatus* DSM 1447, in zakaj je očiten razkorak opazen le v tej genski knjižnici z našimi eksperimentalnimi podatki žal ne moremo podati trdne domneve. Predvidevamo, da je spajanje morda omejevalo specifično nukleotidno zaporedje vključka *B. vulgatus* DSM 1447, ki ga je T4 DNA ligaza težje povezala s plazmidom. Na tem mestu bi morali korak ponoviti še z ostalimi komercialno dostopnimi kompleti, namenjenimi povezovanju vključka s plazmidnim vektorjem, s čimer bi potrdili ali ovrgli domenvo preferenčnega spajanja specifičnih nukleotidnih zaporedij s plazmidnim vektorjem. **(ii)** Morda je med verižno reakcijo s polimerazo prišlo do preferenčnega pomnoževanja genov, ki kodirajo 16S rRNA *R. albus* 7, zaradi česar bi bila koncentracija pomnoženih odsekov DNA *R. albus* 7 večja kot sicer. To bi opravičevalo omenjeno prevlado spajanja vključkov *R. albus* 7 s plazmidnimi vektorji. Zakaj je prišlo do neustreznega pomnoževanja odsekov DNA le pri tem paru bakterijskih vrst, bi morda lahko razložili s filogenetsko sorodnostjo med vrstama, ki je daljna kot pri paru *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23. Vendar elektroforezna slika cepitve pomnožkov genov, ki kodirajo 16S rRNA, pomnoženih iz ekvimolarne mešanice kromosomske DNA dveh vrst (Slika 19, Slika 21) ne potrjuje te domneve. Kljub delni cepitvi na elektroforeznem gelu ni opazne povečane koncentracije produktov cepitve le v prid *R. albus* 7. **(iii)** Kot navajajo Farrelly in sod. (1995) bi morda zgoščena razporeditev operonov *rrn* v bližini mesta začetka podvojevanja lahko povečala učinkovitost pomnoževanja tarčne DNA, s čimer odraz razmerja števila genov, ki kodirajo 16S rRNA ne bi bil realno prikazan. A nazornejši pregled razporeditve operonov *rrn* v kromosому (Priloga C) razkrije, da bližje mestu začetka podvojevanja kromosoma ne najdemo zgoščeno več ribosomskih operonov, temveč so le-ti pri *P. ruminicola* 23, *R. albus* 7 in deloma tudi pri *B. vulgatus* DSM 1447 sorazmerno enakomerno razporejeni po kromosomu. **(iv)** Kot so ovrgli Farrelly in sod. (1995) nepričakovano odstopanje v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst ni pogojeno z razliko med deleži baznih parov G + C v zaporedju 16S rDNA. Tudi pari bakterijskih vrst v naši študiji zavrnejo to idejo. Razlika deležev med

ribosomskimi geni *B. vulgatus* DSM 1447 (42,20 %) in *P. ruminicola* 23 (47,68 %) je namreč večja kot z *R. albus* 7 (46,6 %).

Pomembno je poznavanje tudi ostalih dejavnikov, ki bi lahko vplivali na posamezne korake v procesu kvantifikacije mikrobnih populacij. Vendar zaradi pomankljivega znanja o vplivih parametrov, vpletenih v takšne analize, so zaključki kvantifikacije pogosto izključujoči, saj so v vsakem koraku možne napake ali pristranskosti. Zato bi v oceni morali upoštevati še faktor proliferacije, lize celic, izolacije, čiščenja in kvalitete DNA, specifičnosti hibridizacije začetnih oligonukleotidov (Farrelly in sod., 1995) ter nenazadnje faktor spajanja vključka z vektorjem in transformacije.

Informacija o številu genov RNA male ribosomalne podenote in dolžini genoma sta dva parametra, ki ključno vplivata na količino produkta verižne reakcije s polimerazo, vendar sta danes poznana le za pečico bakterijskih vrst. Zato se strinjamo z objavljenim dognanjem Farrelly-ja in sod. (1995), da je nemogoče kvantificirati število zastopstva vrst iz okoljskih vzorcev v genskih knjižnicah, dokler število operonov *rrn* in dolžina genoma vseh vrst ne bo ugotovljena.

5.2 SKLEPI

- Bioinformacijska analiza števila operonov *rrn* bakterijskih vrst iz debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka, je pokazala razlike ne le na nivoju vrst, temveč tudi med sevi istih vrst.
- Na podlagi znanega števila operonov *rrn* izbrane bakterijske vrste ne moremo vedno sklepati o številu ribosomskih operonov sorodnega taksona.
- Srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S rRNA je v obeh bakterijskih deblih zelo podobna (prebavni trakt: $Me_{Bacteroidetes} = 5,5$; $Me_{Firmicutes} = 5,4$; debelo črevo: $Me_{Bacteroidetes} = 6,3$; $Me_{Firmicutes} = 5$)
- Srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S rRNA se med okoljsko skalo prebavnega trakta in debelega črevesa ne razlikuje bistveno.
- Število operonov *rrn* je v in med bakterijskima deblama raznoliko, a kljub temu se nakazuje tendenca, da prebavni trakt živali in človeka naseljujejo bakterije z večjim številom ribosomskih operonov.
- Deleži genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v ponovitvah genskih knjižnic so med seboj primerljivi.
- Razmerje števila operonov *rrn* vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 se je kazalo v ustrezni zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA v genskih knjižnicah.
- Ne moremo trditi, da bi se število operonov *rrn* pravilno izkazovalo v knjižnicah genov, ki kodirajo 16S rRNA kateregakoli para bakterijskih vrst. To smo dokazali z zastopanostjo genov, ki kodirajo 16S rRNA vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7.

6 POVZETEK

Zaradi dejstva, da imajo bakterije v genomu mnogokratne kopije ribosomskih operonov, je interpretacija mikrobne ekologije in evolucije, s pomočjo genov, ki kodirajo 16S rRNA, postala bolj zapletena. Pričujoče diplomsko delo je bilo tako posredno zasnovano s ciljem ugotavljati meje natančnosti in zanesljivosti ocen raznolikosti posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah na podlagi zastopanosti genov, ki kodirajo 16S ribosomalno RNA.

Z bioinformacijsko analizo smo želeli ugotoviti število genov, ki kodirajo 16S rRNA v znanih in objavljenih genomih bakterij, iz debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka. Kromosomska zaporedja smo pregledali z iskalnima algoritmoma Artemis in blast, ki sta prikazala položaj vseh genov, ki kodirajo 16S, 23S in 5S rRNA. A nabor bakterijskih vrst z uporabno informacijo je bil po končani analizi izredno skop. Pregledali smo genome 8 vrst (od tega 11 sevov) iz bakterijskega debla *Bacteroidetes* in 28 vrst (od tega 47 sevov) iz debla *Firmicutes*. Izkazalo se je, da je srednja vrednost števila genov, ki kodirajo 16S rRNA v genomih izbranih bakterijskih vrst iz obeh debel skoraj enaka ($Me_{Bacteroidetes} = 5,5$; $Me_{Firmicutes} = 5,4$). Kljub temu število genov, ki kodirajo 16S rRNA znotraj in med debloma močno variira – pri *Bacteroidetes* od 1 do 7 kopij, pri *Firmicutes* od 3 do 12 kopij. Zanimalo nas je tudi ali se razporeditev števila genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih sevov, ki poseljujejo debelo črevo, razlikuje od analize vseh uporabnih genomov bakterij iz prebavnega trakta. Ugotovili smo, da se porazdelitev števila genov RNA male ribosomalne podenote ne razlikuje bistveno med analiziranimi okoljskimi skalami. Ne le debelo črevo, temveč celoten prebavni trakt torej naseljujejo bakterije s širokim spektrom števila genov, ki kodirajo 16S rRNA z opazno tendenco večjega števila genov RNA male ribosomalne podenote.

Ker je število ribosomskih operonov na nivoju vrst raznoliko, smo želeli ugotoviti, v kolikšni meri se število operonov *rrn* odraža v zastopanosti genov, ki kodirajo 16S rRNA posameznih bakterijskih vrst v genskih knjižnicah. Izolirano kromosomsko DNA iz kultur izbranih bakterijskih vrst (*B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23; *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7) smo ustrezno redčili tako, da so posamezni alikvoti vsebovali enako število kromosomov vsake vrste. V združeni raztopini smo v verižni reakciji s polimerazo s parom široko specifičnih začetnih oligonukleotidov pomnožili 16S rDNA. Pomnožene tarčne odseke DNA smo povezali s plazmidnim vektorjem pJET1.2/blunt, rekombinantno DNA pa s transformacijo vnesli v kompetentne celice seva *E. coli* TOP10. Ugotavliali smo delež genov, ki kodirajo 16S rRNA izbranih vrst v genskih knjižnicah. Vključkom rekombinantnega plazmidnega vektorja knjižnic transgenih celic smo ugotovili identiteto na podlagi dolžin produktov verižne reakcije s polimerazo in/ali njihovih restriktionskih profilov.

Eksperimentalni rezultati so kazali večja odstopanja, kot smo jih teoretično pričakovali (7:4). Zastopanost genov, ki kodirajo 16S rRNA bakterijskih vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *P. ruminicola* 23 v genskih knjižnicah je sprejemljivo (7:2,1). A kljub ustreznemu zastopstvu genov za RNA male ribosomalne podenote je še prenagljeno trditi, da bi se trend izkazoval v knjižnicah genov, ki kodirajo 16S rRNA, kateregakoli para bakterijskih vrst. To smo dokazali z zastopanostjo genov, ki kodirajo 16S rRNA vrst *B. vulgatus* DSM 1447 in *R. albus* 7. Odstopanje v prid genov RNA male ribosomalne podenote *R. albus* 7 je bilo namreč izredno visoko (7:161,7).

Število genov, ki kodirajo 16S rRNA in dolžina genoma sta parametra, zahtevana že pri kvantificiranju najenostavnjejših strukturnih združb (dveh vrst). A zaradi slabe kvalitete genomskeh informacij v podatkovnih bazah mnogokrat ne moremo ugotoviti števila operonov *rrn*, ki se ne kaže vedno v pričakovanem zastopstvu v genskih knjižnicah. Zato lahko zaključimo, da z današnjimi metodami, ki temeljijo na analizah knjižnic genov, ki kodirajo 16S rRNA, kvantifikacija mikrobnih združb ni vedno realno ocenjena.

7 VIRI

- Abd-Elsalam K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2, 5: 91-95
- Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F. 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, 186, 9: 2629-263
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403-410
- Amann R.I., Wolfgang L., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169
- Amann G., Stetter K.O., Llobet-Brossa E., Amann R., Anton J. 2000. Direct proof for the presence and expression of two 5 % different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. *Extremophiles*, V4, 6: 373-376
- Ashelford K.E., Weightman A.J., Fry J.C. 2002. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 30, 15: 3481-3489
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moor D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1999. Current protocols in molecular biology. New York, Harvard Medical School, J.Wiley and Sons: 202 str.
- Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Young Koh G., Nagy A., Semenkovich C.F., Jeffrey I. Gordon J.I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 44: 15718-15723
- Benno Y., Sawada K., Mitsuoka T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiology and Immunology*, 28, 9: 975-986
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. 2010. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 39: D32-D37
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293-300
- Boros I., Kiss A., Venetianer P. 1979. Physical map of the seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 6, 5: 1817-1830
- Branlant C., Krol A., Machatt M.A., Pouyet J., Ebel J.-P., Edwards K., Kössel H. 1981. Primary and secondary structures of *Escherichia coli* MRE 600 23S ribosomal RNA. Comparison with models of secondary structure for maize chloroplast 23S rRNA and for large portions of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 9, 17: 4303-4321
- Brooks J.R., Smith H.F., Pease F.B. 1974. Bacteriology of the stomach immediately following vagotomy: the growth of *Candida albicans*. *Annals of Surgery*, 179, 6: 859-862
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25, 12: 1324-1328
- Casamayor E.O., Pedrós-Alio C., Muyzer G., Amann R. 2002. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic

- environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1706-1714
- Cato E.P., George W.L., Finegold S.M. 1986. Genus *Clostridium*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Krieg N.R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 1141-1200
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31: 3497-3500
- Cole S.T., Girons I.S. 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 14: 139-160
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Bandela A.M., Cardenas E., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*, 35: D169-D172
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37: D141-D145
- Condon C., Philips J., Fu Z.-Y., Squires C., Squires C.L. 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 11: 4175-4185
- Condon C., French S., Squires C., Squires C.L. 1993. Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO Journal*, 12, 11: 305-4315
- Condon C., Liveris D., Squires C., Schwartz I., Squires C.L. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of Bacteriology*, 177, 14: 4152-4156
- Coyne M.J., Comstock L.E. 2008. Niche-specific features of the intestinal *Bacteroidales*. *Journal of Bacteriology*, 190, 2: 736-742
- Crosby L.D., Criddle C.S. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *BioTechniques*, 34, 4: 2-9
- Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16: 10494-10499
- Daniel A.S., Martin J., Vanat I., Whitehead T.R., Flint H.J. 1995. Expression of a cloned cellulase xylanase gene from *Prevotella ruminicola* in *Bacteroides vulgaris*, *Bacteroides uniformis* and *Prevotella ruminicola*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 4: 417-424
- Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27, 1: 1-20
- Davey H.M., Kell D.B. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*, 60: 641-696

- Delwiche C.F., Kushel M., Palmer J.D. 1995. Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. Molecular Phylogenetics and Evolution, 4: 110-128
- Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature, 449, 7164: 811-818
- Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. septembra 2000 o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu. 2000. Uradni list Evropske unije, 43, L262: 21-45
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T., Wilson A. 2011. Geneious v5.4. Auckland, Biomatters Ltd: software
<http://www.geneious.com/> (29. mar. 2012)
- Dryden S., Kaplan S. 1990. Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. Nucleic Acids Research, 18: 7267-7277
- Duan C.-J., Liu J.-L., Feng J.-X. 2011. Cloning and identification of genes encoding acidic cellulases from the metagenomes of buffalo rumen. V: Handbook of molecular microbial ecology II: metagenomics in different habitats. De Bruijn F.J. (ed.). Hoboken, Wiley-Blackwell Hoboken, J.Wiley and Sons: 229-244
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, 308: 1635-1638
- Eggerth A.H., Gagnon B.H. 1933. The *Bacteroides* of human feces. Journal of Bacteriology, 25, 4: 389-413
- Eisen J.A. 1995. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. Journal of Molecular Evolution, 41, 12: 1105-1123
- Ellwood M., Nomura M. 1980. Deletion of a ribosomal ribonucleic acid operon in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 143, 2: 1077-1080
- Fabia R., Ar'rajab A., Johansson M.L., R. Willén R., Andersson R., Molin G., Bengmark S. 1993. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and aat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 28, 2: 155-162
- Falony G., Verschaeren A., Bruycker F., De Preter V., Verbeke K., Leroy F., De Vuyst L. 2009. *In vitro* kinetics of prebiotic inulin-type fructan fermentation by butyrate-producing colon bacteria: implementation of online gas chromatography for quantitative analysis of carbon dioxide and hydrogen gas production. Applied and Environmental Microbiology, 75, 18: 5884-5892
- Farrelly V., Rainey F.A., Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied and Environmental Microbiology, 61, 7: 2798-2801
- Ferme D. 2008. Vpliv izvlečkov česna in cimeta ter kostanjevih taninov na strukturo mikrobne združbe iz prebavnega trakta prežvekovalcev in kuncev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 261 str.
- Fermentas. 2012a. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Glen Burnie, Thermo Fischer Scientific: 1 str.
<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm031-generuler-1kb> (29. mar. 2012)

- Fermentas. 2012b. pJET1.2/blunt. Glen Burnie, Thermo Fischer Scientific: 1 str.
<http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pjet12> (29. mar. 2012)
- Ferullo D.J., Lovett S.T. 2008 The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*. PLOS Genetics, 4, 12: e1000300, doi:10.1371/journal.pgen.1000300: 15 str.
- Field K.G., Gordon D., Wright T., Rappe M., Urbach E., Vergin K., Giovannoni S.J. 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 63, 1: 63-70
- Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Krikness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.-F., Dougherty B.A., Merrick J.M., McKenney K., Sutton G., FitzHugh W., Fields C., Gocayne J.D., Scott J., Shirley Fogel G.B., Collins C.R., Li J., Brunk C.F. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. Microbial Ecology, 38: 93-113
- Fogel G.B., Collins C.R., Li J., Brunk C.F. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. Microbial Ecology, 38: 93-113
- Fox G.E., Woese C.R. 1975. The architecture of 5S rRNA and its relation to function. Journal of Molecular Evolution, 6: 61-76
- Fox G.E., Pechman K.R., Woese C.R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. International Journal of Systematic Bacteriology, 27, 1: 44-57
- Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtschuk J.P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 1: 166-170
- Frank D.N., Pace N.R. 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. Current Opinion in Gastroenterology, 24: 4-10
- Fukunaga M., Mifuchi I. 1989. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. Journal of Bacteriology, 171, 11: 5763-5767
- Gibson G.R., Cummings J.H., Macfarlane G.T., Allison C., Segal I., Vorster H.H., Walker A.R.P. 1990. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. Gut, 31: 679-683
- Gill S.R., Pop M., DeBoy R., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, 312: 1255-1359
- Glasel, J.A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by A_{260}/A_{280} absorbance ratios. Biotechniques, 18: 62-63
- Gronow S., Held B., Lucas S., Lapidus A., del Rio T.G., Nolan M., Tice H., Deshpande S., Cheng J.-F., Pitluck S., Liolios K., Pagani I., Ivanova N., Mavromatis K., Pati A., Tapia R., Han C., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C.D., Brambilla E.-M., Rohde M., Göker M., Detter J.C., Woyke T., Bristow J., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Eisen J.A. 2011. Complete genome sequence of *Bacteroides salanitronis* type strain (BL78T). Standards in Genomic Sciences, 4: 191-199
- Guarner F., Malagelada J.-R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet, 361, 9356: 512-519

- Gunderson J., Sogin H.M.L., Wollett G., Hollingdale M., de la Cruz V.F., A. P. Waters A.P., McCutchan T.F. 1987. Structurally distinct, stage specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, 238: 933-937
- Hartmann R.K., Erdmann V.A. 1989. *Thermus thermophilus* 16S rRNA is transcribed from an isolated transcription unit. *Journal of Bacteriology*, 171, 6: 2933-2941
- Head I.M., Saunders R.J., Pickup R.W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35: 1-21
- Heinonen T.Y.K., Schnare M.N., Gray M.W. 1990. Sequence heterogeneity in the duplicated large subunit ribosomal RNA genes of *Tetrahymena pyriformis* mitochondrial DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 22336-22341
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol. 3. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic Press: 133-149
- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannan B.J.M. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 10: 4399-4406
- Huycke M.M., Abrams V., Moore D.R. 2002. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, 23, 3: 529-536
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 64 str.
- Invitrogen™. 2004. Instruction manual. pBAD TOPO® TA Cloning Kit. Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products for regulated expression in *E. coli*. Carlsbad, Invitrogen Corporation: 4-4
- Jeffares D.C., Poole A.M., Penny D.J. 1998. Relics from the RNA world. *Journal of Molecular Evolution*, 46: 18-36
- Jerman V., Avguštin G. 2010. Prebavna mikrobiota kot dejavnik pri razvoju debelosti. *Acta agriculturae Slovenica*, 96, 1: 27-26
- Kakirde K.S., Parsley L.C., Liles M.R. 2010. Size does matter: application – driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 11: 1911-1923
- Kelly W.J., Leahy S.C., Altermann E., Yeoman C.J., Dunne J.C., Kong Z., Pacheco D.M., Li D., Noel S.J., Moon C.D., Cookson A.L., Attwood G.T. 2010. The glycobiome of the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus* B316T highlights adaptation to a polysaccharide-rich environment. *PloS ONE*, 5, 8: e11942, doi:10.1371/journal.pone.0011942: 9 str.
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1328-1333
- Klemenčič N. 2006. Fenotipska in genotipska opredelitev bakterijskih izolatov iz morskih in sladkovodnih sedimentov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 80 str.

- Klenk H.-P., Zillig W. 1994. DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. *Journal of Molecular Evolution*, 38: 420-432
- Klepac-Ceraj V., Bahr M., Crump B.C., Teske A.P., Hobbie J.E., Polz M.F. 2004. High overall diversity and dominance of microdiverse relationships in salt marsh sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, 6, 7: 686-698
- Koike S., Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 2: 361-366
- Konstantinov S.R., Awati A., Smidt H., Williams B.A., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus* – like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 3821-3830
- Kopecný J., Hager J., Mrázek J. 2004. Detection of cellulolytic bacteria from the human colon. *Folia Microbiologica*, 49, 2: 175-177
- Kosuge T., Abe T., Okido T., Tanaka N., Hirahata M., Maruyama Y., Tomiki A., Mashima J., Kurokawa M., Himeno R., Miyazaki S., Gojobori T., Tateno Y., Sugawara H. 2006. Exploration and grading of possible genes in 183 bacterial strains by a common fine protocol lead to new genes: gene trek in prokaryote space (GTPS). *DNA Research*, 13: 245-254
- Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škobrne M., Wraber B. 2001. Imunologija: priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 75 str.
- Kryukov K. 2012. Genome composition database. Mishima, Saitou lab, National Institute of Genetics: 1 str.
http://esper.lab.nig.ac.jp/study/genome/genome_details.cgi?sp=Bacteroides+vulgaris+ATCC+8482&print=summary&print=letter_composition&print=scaled_frequency_graphs&print=unscaled_frequency_graphs&print=spacing_graphs&print=spacing_graphs_2 (29. mar. 2012)
- Kulagina E.V., Efimov B.A., Maximov P.Y., Kafarskia L.I., Chaplin A.V., Shkoporov A.N. 2012. Species composition of *Bacteroidales* order *Bacteria* in the feces of healthy people of various ages. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 1: 169-171
- Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma V.K., Srivastava T.P., Taylor T.D., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich D.S., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., Tetsuya Hayashi T., Hattori M. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, 14: 169-181
- Lane D.J., Pace B., Olsen O.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. 1985. Rapid determination of 16S rRNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 6955-6959
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948
- Lathrop S.K., Bloom S.M., 2, Rao S.M., Nutsch K., Lio C.-W., Santacruz N., Peterson D.A., Stappenbeck T.S., Hsieh C.-S. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478, 7368: 250-254

- Leamon J.H., Lee W.L., Tartaro K.R., Lanza J.R., Sarkis G.J., deWinter A.D., Berka J., Lohman K.L. 2003. A massively parallel PicoTiterPlate (TM) based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis*, 24, 1: 3769-3777
- Lee S.H., Chae J.P., Kim M.J., Kang D.-K. 2010. Isolation of *Bacillus amyloliyuefaciens* ATC6 producing acid cellulase. *Journal of Animal Science and Technology*, 52, 1: 65-70
- Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 31: 11070-11075
- Li D., Wang J.Q., Bu D.P. 2012. Ruminal microbe of biohydrogenation of trans-vaccenic acid to stearic acid *in vitro*. *BMC Research Notes*, 5, 97: 1-8
- Lidbeck A., Geltner Allinger U., Orrhage K.M., Ottova L., Brismar B., Gustafsson J.-Å., Rafter J.J., Nord C.E. 1991. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 4, 2: 81-88
- Liezack W., Stackebrandt E. 1989. Evidence for unlinked *rrn* operons in the planctomycete *Pirellula marina*. *Journal of Bacteriology*, 171, 9: 5025-5030
- Lin I.H., Liu T.-T., Teng Y.-T., Wu H.-L., Liu Y.-M., Wu K.-M., Chang C.-H., Hsu M.T. 2011. Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PloS ONE*, 6, 5: e20519, doi:10.1371/journal.pone.0020519: 17 str.
- Lopez-Siles M., Khan T.M., Duncan S.H., Harmsen H.J.M., Garcia-Gil L.J., Flint H.J. 2012. Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic faecalibacterium prausnitzii can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2: 420-428
- Loughney K., Lund E., Dahlberg J.E. 1983. Deletion of an rRNA gene set in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 154, 1: 529-532
- Ludwig W., Kirchhof G., Klugbauer N., Weizenegger M., Betzl D., Ehrmann M., Herlel C., Jilg S., Tatzel R., Zitzelsberger H., Liebl S., Hochberger M., Shah J., Lane D., Wallnöfer P.R., Shleifer K.H. 1992. Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G plus C content. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 487-501
- Ludwig W., Neumaier J., Klugbauer N., Brockmann E., Roller C., Jilg S., Reetz K., Schachtner I., Ludvigsen A., Bachleitner M., Fischer U., Schleifer K.H. 1994. Phylogenetic relationships of *Bacteria* based on comparative sequence analysis of elongation factor TU and ATP-synthase beta-subunit genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64: 285-305
- Ludwig W., Schleifer K.-H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 155-173
- Macrae A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 77-82
- Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., Roca J., Dore J. 2005. Inflammatory bowel disease. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55: 205-211

- Marchesi J., Shanahan F. 2007. The normal intestinal microbiota. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20: 508-513
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z.T., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., Mcdade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P.G., Begley R.F., Rothberg J.M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437: 376-380
- Mättö J., Asikainen S., Väistönen M.-L., Rautio M., Saarela M., Summanen P., Finegold S., Jousimies-Somer H. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 194-198
- Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 1: 107-118
- McCutchan T.F., de la Cruz V.F., Lal A.A., Gunderson J.H., Elwood H.J., Sogin M.L. 1988. Primary sequence of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 28: 63-68
- Medlin L., Elwood H.I., Stickel S., Sogin M.L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like ribosomal RNA-coding regions. *Gene*, 71: 491-500
- Michaux S., Paillisson J., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Allardet-Servent A., Ramuz M. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology*, 175: 701-705
- Mylvaganam S., Dennis P.P. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics*, 130: 399-410
- Namavar F., Theunissen E.B.M., Verweij-Van Vught A.M.J.J., Peerbooms P.G.H., Bal M., Hoitsma H.F.W., MacLaren D.M. 1989. Epidemiology of the *Bacteroides fragilis* group in the colonic flora in 10 patients with colonic cancer. *Journal of Medical Microbiology*, 29: 171-176
- Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 431-438
- Nomura M., Course R., Baughman G. 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 75-117
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 9, 5636-5643
- O'Hara A.M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 688-693

- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. 1986. Annual Review of Microbiology, 40: 337-365
- Olsen G.J., Woese C.R., Overbeek R. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. Journal of Bacteriology, 176: 1-6
- Osawa R., Sasaki E. 2004. Novel observations of genotypic and metabolic characteristics of three subspecies of *Streptococcus gallolyticus*. Journal of Clinical Microbiology, 42, 10: 4912-4913
- Pace N.R., Olsen G.J., Woese C.R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. Cell, 45: 325-326
- Pado R., Pawłowska-Cwiek L. 2005. The uptake and accumulation of iron by the intestinal bacterium *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771. Folia Biologica, 53, 1/2: 79-81
- Polyanichko A.M., Andrushchenko V.V., Chikhirzhina E.V., Vorob'ev V.I., Wieser H. 2004. The effect of manganese (II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. Nucleic Acids Research, 32, 3: 989-996
- Postgate J.R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge, Cambridge University Press: 232 str.
- Prüß B.M., Francis K.P., von Stetten F., Scherer S. 1999. Correlation of 16S ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group. Journal of Bacteriology, 181, 8: 2624-2630
- Purushe J., Fouts D.E., Morrison M., White B.A., Mackie R.I., Coutinho P.M., Henrissat B., Nelson K.E. 2010. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche. Microbial Ecology, 60, 4: 721-729
- Rainey F.A., Ward-Rainey N.L., Janssen P.H., Hippe, H., Stackebrandt, E. 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. Microbiology, 142: 2087-2095
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell, 118, 2: 229-241
- Ree H.K., Zimmermann R.A. 1990. Organization and expression of the 16S, 23S and 5S ribosomal RNA genes from the archaeabacterium *Thermoplasma acidophilum*. Nucleic Acids Research, 18, 15: 4471-4478
- Römling U., Grothues D., Bautsch W., Tymmler B. 1989. A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. EMBO Journal, 8: 4081-4089
- Ross W., Thompson J.F., Newlands J.T., Gourse R.L. 1990. *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. EMBO Journal, 9, 11: 3733-3742
- Rudner R., Chevrestt A., Buchholz S.R., Studamire B., White A., Jarvis E.D. 1993. Two tRNA gene clusters associated with rRNA operons *rrnD* and *rrnE* in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 175, 2: 503-509
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A., Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics, 16, 10: 944-945
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York, Cold Springs Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 3. zv. (loč. pag.)

- Sass H., Wieringa E., Cypionka H., Babenzen H.-D., Overmann J. 1998. High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives of Microbiology*, 170, 4: 243-251
- Shapiro H.M. 2003. Practical flow cytometry. 4th ed. New York, J.Wiley and Sons: 681 str.
- Sharpless T.K., Bartholdi M., Melamed M.R. 1977. Size and refractive index dependence of simple forward angle scattering measurements in a flow system using sharply-focused illumination. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25, 7: 845-856
- Sleator R.D., Shortall C., Hill C. 2008. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 361-366
- Smith W.J.M., Conlan L.L., M. Gough J.M., Williamson M.A., McSweeney C.S. 2003. Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. *Microbiology*, 149: 57-65
- Sogin S.J., Sogin M.L., Woese C.R. 1972. Phylogenetic measurement in prokaryotes by primary structural characterization. *Journal of Molecular Evolution*, 1: 173-184
- Stackebrandt E., Goebel B.M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 846-849
- Straus D.B., Walter W.A., Gross C.A. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature*, 329: 348-351
- Suen G., Stevenson D.M., Bruce D.C., Chertkov O., Copeland A., Cheng J.-F., Detter C., Detter J.C., Goodwin L.A., Han C.S., Hauser L.J., Ivanova N.N., Kyrpides N.C., Land M.L., Lapidus A., Lucas S., Ovchinnikova G., Pitluck S., Tapia R., Woyke T., Boyum J., Mead D., Weimer P.J. 2011. Complete genome of the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7. *Journal of Bacteriology*, 193, 19: 5574-5575
- Svetoch E.A., Stern N.J., Eruclanov B.V., Kovalev Y.N., Volodina L.I., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Pokhilko V.D., Borzenkov V.N., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Kudriavtseva T.Y. 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *Journal of Food Protection*, 68, 1: 11-17
- Szostková M., Horáková D. 1998. The effect of plasmid DNA sizes and other factors on electrotransformation of *Escherichia coli* JM109. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 47: 319-323
- Tannock G. W. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, 1, 1: 53-64
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.-P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L.E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, 10: 2574-2584
- Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F. 2002. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296: 1064-1066
- Torsvik V., Sørheim R., Goksøy J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 170-178
- Tuorova T.P., Kuznetsov B.B., Novikova E.V., Poltarau A.B., Nazina T.N. 2001. Heterogeneity of the nucleotide sequence of the 16S rRNA genes of the type strain of *Desulfotomaculum kuznetsovii*. *Microbiology*, 70, 6: 678-684

- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.-M., Knight R., Gordon J.I. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature*, 449, 804-810
- Viale A.M., Arakaki A.K., Soncini F.C., Ferreyra R.G. 1994. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 527-533
- Vogel U., Jensen K.F. 1994. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *Journal of Bacteriology*, 176, 10: 2807-2813
- Wang R.-F., Caow W.-W., Cerniglia C.E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4: 1242-1247
- Wang Y., Zhang Z., Ramanan N. 1997. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, 179: 3270-3276
- Warburg O., Christian W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310: 384-421
- Weese J.S., Anderson M.E.C. 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Canadian Veterinary Journal*, 43: 771-774
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703
- 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
- Widom R.L., Jarvis E.D., LaFauci G., Rudner R. 1988. Instability of rRNA operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170, 2: 605-610
- Wilson K.H., Blitchington R.B. 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 7: 2273-2278
- Wittmann H.-G. 1975. The seventh sir Hans Krebs lecture: structure, function and evolution of ribosomes. *European Journal of Biochemistry*, 61: 1-13
- Woese C.R., Fox G.E., Zablen L., Uchida T., Bonen L., Pechman K., Lewis B.J., Stahl D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 254, 5495: 83-86
- Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271
- Woese C.R., Andler O., Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 4576-4579
- Woese C.R., Olsen G.J., Ibba M., Söll D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 1: 202-236
- Xu J., Mahowald M.A., Ley R.E., Lozupone C.A., Hamady M., Martens E.C., Henrissat B., Coutinho P.M., Minx P., Latreille P., Cordum H., Van Brunt A., Kim K., Fulton R.S., Fulton L.A., Clifton S.W., Wilson R.K., Knight R.D., Gordon J.I. 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biology*, 5, 7: 1574-1586
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 1: 103-19

- Yap W.H., Zhang Z., Wang Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal gene transfer of an entire rRNA operon. *Journal of Bacteriology*, 181, 17: 5201-5209
- Zaporozets D., French S., Squires C.L. 2003. Products transcribed from rearranged *rrn* genes of *Escherichia coli* can assemble to form functional ribosomes. *Journal of Bacteriology*, 185, 23: 6921-6927
- Zimmer R., Verrinder Gibbins A.M. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 42, 2: 217-226
- Zinkevich V., Beech I.B. 2000. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiology Ecology*, 34: 147-155
- Zuckerkandl E., Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8: 357-366
- Žgur – Bertok D., Starčič Erjavec M. 2008. Navodila za vaje iz predmeta Mikrobnata genetika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 75 str.

ZAHVALA

Hvala vsem, ki ste pripomogli k nastanku pričujočega diplomskega dela, saj si zaslug vsekakor ne drznem lastiti sama.

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Tomažu Accettu. Hvala, da si si vedno vzel čas za moja vprašanja, za razpravo o tekočem delu in napredku. Hvala za potrpežljivost ter prilagodljivost, hvala za trud, strokovne nasvete in ostre kritike.

Zahvaljujem se doc. dr. Blagajani Herzog Velikonji za skrbno in temeljito recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem se mag. Luki Lipoglavšku za izvedbo meritev s pretočnim citometrom in vse nasvete, ki so mi olajšali delo.

Zahvaljujem se prof. dr. Gorazdu Avguštinu za predlagano temo diplomskega dela.

Zahvala za pomoč gre tudi mladima raziskovalkama Brigit Nograšek in Katji Gorenc. Hvala za pomoč, optimizem, vzpodbude pri delu, prijetno družbo in popoldanske pogovore.

Iskreno se zahvaljujem Marti Majdič za vso nesebično pomoč in iskrene jutranje pozdrave.

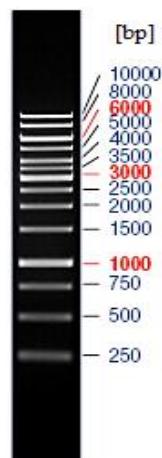
Hvala vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo za neusahljivo dobro voljo. Hvala, ker ste strpno prenašali objestno zasedanje računalnika, inkubatorjev, cikičnih sistemov in predvsem vseh elektroforetskih banjic.

In nenazadnje hvala Siru Williamu Thomsonu, ki je verjel, da »znanost zavezuje večni zakon časti, da brez strahu opazi vsak problem, ki bi ga lahko na primeren način raziskala«.

PRILOGE

Priloga A

Raztopina fragmentov DNA umerjenega velikostnega standarda GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)

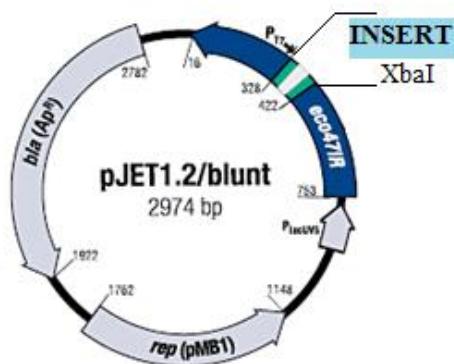


Oznaki:

ⁱ Ob desnem robu slike so dopisane velikosti prog umerjenega velikostnega standarda. ⁱⁱ Povzeto po: Fermentas (2012a)

Priloga B

Karta plazmida pJET1.2/blunt z označenimi nekaterimi pomembnejšimi mesti



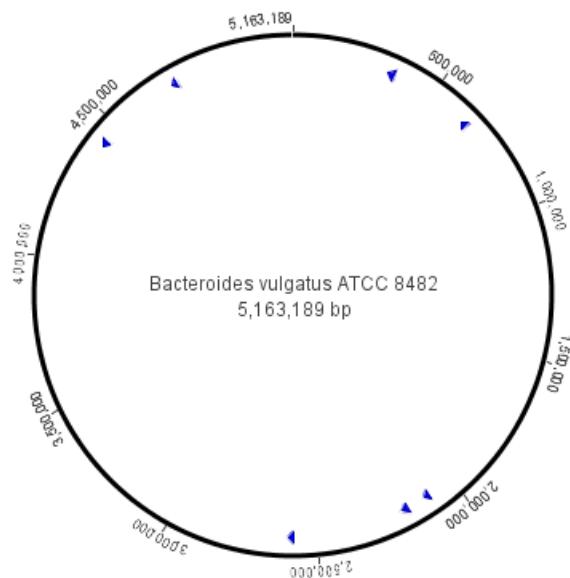
Oznaka:

ⁱ Povzeto po: Fermentas (2012b)

Priloga C

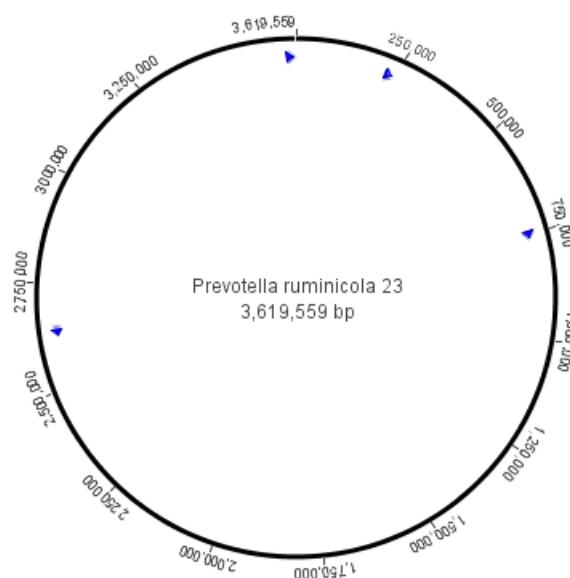
Genomske karte in mesta genov, ki kodirajo ribosomsko RNA v genomih

(a) Genomska karta in mesta genov, ki kodirajo rRNA v genomu *B. vulgatus* DSM 1447



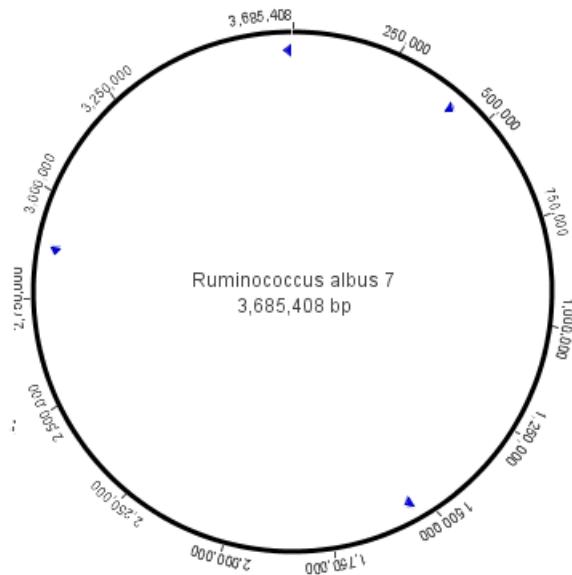
Operon <i>rrn</i>	16S rDNA	23S rDNA	5S rDNA
A	346743-348252 ^K	343479-346279 ^K	343154-343304 ^K
B	647842-649351 ^K	644595-647392 ^K	644263-644416 ^K
C	2095441-2086950	2097403-2100203	2100376-2100526
D	2183533-2185042	2185488-2188316	2188468-2188621
E	2587720-2589229	2589683-2592483	2592656-2592806
F	4430477-4431986 ^K	4427224-4430024 ^K	4426898-
G	4743110-4744649 ^K	4739983-4742686 ^K	4739563-

(b) Genomska karta in mesta genov, ki kodirajo rRNA v genomu *P. ruminicola* 23



Operon <i>rrn</i>	16S rDNA	23S rDNA	5S rDNA
A	223917-225405	225944-228775	228912-229022
B	750628-752116	752691-755522	755722-755832
C	2635968-2637456 ^K	2632610-2635441 ^K	2632363-2632473 ^K
D	3605770-3607258	3607904-3610735	3610872-3610982

(c) Genomska karta in mesta genov, ki kodirajo rRNA v genomu *R. albus* 7



Operon <i>rrn</i>	16S rDNA	23S rDNA	5S rDNA
A	417348-418847	419331-422164	422232-422348
B	1548328-1549826	1550331-1553165	1553233-1553349
C	2867312-2868810 ^K	2863973-2866807 ^K	2863789-2863905 ^K
D	3675459-3676957 ^K	3672121-3674954 ^K	3671937-3672053 ^K

Oznake:

^K Zapis na komplementarni verigi DNA.

ⁱ Modre puščice v genomski karti označujejo mesta operonov *rrn* in njihovo orientacijo. ⁱⁱ Obdelava genomskih kart s programom Geneious 5.5 (Drummond in sod., 2011). ⁱⁱⁱ Mesta genov, ki kodirajo ribosomsko RNA v genomu so bila najdena z algoritmoma Artemis (Rutherford in sod., 2000) in blast (Altschul in sod., 1990).

Priloga D

Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA v smeri 5'→3' formata GenBank

(a) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T

```

1 AGACACGGTC CAAANTCNTA CGGGAGGCAG CAGTGAGGAA TATTGGTCAA
51 TGGGNGAGAG CCTGAACCAG CCAAGTAGCG TGAAGGATGA CTGCCCTATG
101 GGTTGTAAAC TTNTTTATA AAGGAATAAA GTCGGGTATG GATACCCGTT
151 TGCATGTACT TTATGAATAA GGATCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG
201 GTAATACGGA GGATCCGAGC GTTATCCGGA TTTATTGGGT TTAAAGGGAG
251 CGTAGATGGA TGTNTAACGTC AGTTGTGAAA GTNTGCGGCT CAACCGTAAA

```

se nadaljuje

nadaljevanje

(a) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T

301 ATTGCAGTTG ATACTGGATA TCTTGAGTGC AGTTGAGGCA GGCAGGAATT
351 GTGGGTGAGC GGTGAAATGC TTAGATATCA CGAGGAACTC CGATTGCGAA
401 GGCAGCCTGC TAAGCTGCAA CTGACATTGA GGCTCGAAAG TGTGGGTATC
451 AAACAGGATT AGATAACCCCTG GTAGTCCACA CGGTAACAGA TGAATACTCG
501 CTGTTGCGA TATACGGCAA CGGGCCAAGC GAAAGCGTTA AGTATTCCAC
551 CTGGGGAGTA CGCCGGCAAC GGTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCC
601 GCACAAGCGG AGGAACATGT GGTTAATTG GATGATACGC GAGGAACCT
651 ACCCGGGCTT AAATTGCAGA TGAATTACGG TGAAAGCCGT AAGCCGCAAG
701 GCATCTGTGA AGGTGCTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGC CGTGAGGTGT
751 CGGCTTAAGT GCCATAACGA GCGCAACCCT TGTTGTCAGT TACTAACAGG
801 TTCTGCTGAG GACTCTGACA AGACTGCCAT CGTAAGATGT GAGGAAGGTG
851 GGGATGACGT CAAATCAGCA CGGCCCTTAC GTCCGGGCT ACACACGTGT
901 TACAATGGGG GGTACAGAGG GCCGCTACCA CGCGAGTGGA TGCCAATCCC
951 AAAAACCTCT CTCAGTCGG ACTGGAGTCT GCAACCCGAC TCCACGAAGC
1001 TGGATTGCGT AG

//

(b) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Prevotella ruminicola* Bryant 23^T

1 GGAACGTGAGA CACGGTCAA ANTNNNTACGG GAGGCAGCAG TGAGGAATAT
51 TGGTCAATGG ACGGAAGTNT GAACCAGCCA AGTAGCGTGC AGGATGACGG
101 CCCTATGGGT TGTAAACTGC TTTTATATAG GGATAAAAGTC GGGGACGTGT
151 CCCCGTTGT AGGTACTATA TGAATAAGGA CCGGCTAATT CCGTGCCAGC
201 AGCCGCGGT AATACGGAAGG TCCGGCGTT ATCCGGATNT ATTGGGTTA
251 AAGGGAGCGC AGGCTGATGA TTAAGCGTGA CGTGAATGT AGCCGCTCAA
301 CGGCTGAACT GCGTCGCGAA CTGGTTATCT TGAGTGAGTT CGATGTTGGC
351 GGAATTCTGT GTGTAGCGGT GAAATGCTTA GATATCACGA AGAACTCCGA
401 TTGCGAAGGC AGCCAACAAG GCCTTTACTG ACGCTAAAGC TCGAAGGTGC
451 GGGTATCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCGCACGG TAAACGATGG
501 ATGCCCGCTG TTTGCGATAT ACTGTGAGCG GCCAAGAGAA ATCGTTAACG
551 ATCCCACCTG GGGAGTACGC CGGCAACGGT GAAACTCAAA GGAATTGACG
601 GGGGCCGCA CAAGCGGAGG AACATGTGGT TTAATTGCGAT GATACGCGAG
651 GAAACCTTACC CGGGCTTGAA CTGCCAGCGA ACGATTACGA GATGATGAGG
701 TCCTTCGGGA CGCTGGTGG A GGTGCTGCAT GGTTGTCGT AGCTCGTGC
751 GTGAGGTGTC GGCTTAAGTG CCATAACGAG CGCAACCCTT TTCTTTAGTT
801 GCCATCAGGT AATGCTGGGC ACTCTGGAGA TACTGCCACC GTAAGGTGTG
851 AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCAGCAC GGCCCTTACG TCCGGGGCTA
901 CACACGTGTT ACAATGGGG GTACAGAGAG TCGGATATAC GCAAGTATGT
951 TCTAATCCTT AAAGCCTTCC TCAGTCGGA TTGGGGTCTG CAACCCGACC
1001 CCATGGAGCT GG

//

(c) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T

1 NNNNATTGGAA CTGAGACNCA GTCCAAANTC NTACGGGAGG CAGCAGTGAG
51 GAATATTGGT CAATGGGNGA GAGCCTGAAC CAGCCAAGTA GCGTGAAGGA
101 TGACTGCCCT ATGGGTTGTA AACTTNTNTT ATAAAGGAAT AAAGTCGGGT
151 ATGGATACCC GTTTGCGATGT ACTTTATGAA TAAGGATCGG CTAACTCCGT
201 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGATCCG AGCGTTATCC GGATNTATTG
251 GGTTTAAAGG GAGCGTAGAT GGATATTAA GTCAAGTTGT AAAGTTGCG
301 GCTCAACCGT AAAATTGCAG TTGATACTGG ATATCTTGAG TGCAGTTGAG
351 GCAGGCGGAA TTCGTGGTGT AGCGGTGAAA TGCTTAGATA TCACGAAGAA
401 CTCCGATTGC GAAGGCAGCC TGCTAAGCTG CAACTGACAT TGAGGCTCGA
451 AAGTGTGGGT ATCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACACGGTAAA
501 CGATGAATAC TCGCTGTTG CGATATACTG CAAGCGGCCA AGCGAAAGCG

se nadaljuje

nadaljevanje

(c) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Bacteroides vulgatus* DSM 1447^T

551 TTAAGTATTC CACCTGGGGA GTACGCCGGC AACGGTGAAA CTCAAAGGAA
601 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGAGGAACA TGTGGTTAA TTCGATGATA
651 CGCGAGGAAC CTTACCCGGG CTTAAATTGC AGATGAATT CGGTGAAAGC
701 CGTAAGCCGC AAGGCATCTG TGAAGGTGCT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG
751 TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTACTGTT
801 AGTTGCTACG CAAGAGCACT CTAGCAGGAC TGCCGTTGAC AAAACGGAGG
851 AAGGTGGGGA TGACGTCAAA TCATCATGCC CCTTATGACC TGGGCTACAC
901 ACGTACTACA ATGGCTGTTA ACAGAGGGAA GCAAAACAGT GATGTGGAGC
951 AAAACCCCTAA AAGCAGTCTT AGTCGGATT GTAGGCTGCA ACCCGCCTAC
1001 ATGAAGTCGG AA
//

(d) Nukleotidno zaporedje gena, ki kodira 16S rRNA *Ruminococcus albus* 7^T

1 GAGGCNNNAA AGCNTGGGGA GCAAACANGA TNAGATACCC TGGTAGTCCA
51 CGCCGTAAAC GATGATTACT AGGTGTGGGG GGACTGACCC CTTCCGTGCC
101 GCAGTTAACCA CAATAAGTAA TCCACCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGCTGA
151 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACCA AGCAGTGGAG TATGTGGTT
201 AATTGCAAGC AACGCGAAGA ACCTTACCAAG GTCTTGACAT CGTACGCATA
251 GCATAGAGAT ATGTGAAATC CCTTCGGGGA CGTATAGACA GGTGGTGCAT
301 GGTTGTCGTC AGCTCGTGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAACGTC CCGCAACGAG
351 CGCAACCCTT ACTGTTAGTT GCTACGCAAG AGCACTCTAG CAGGACTGCC
401 GTTGACAAAA CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT
451 ATGACCTGGG CTACACACGT ACTACAATGG CTGTTAACAG AGGGAAGCAA
501 AACAGTGATG TGGAGCAAAA CCCTAAAAGC AGTCTTAGTT CGGATTGTAG
551 GCTGCAACCC GCCTACATGA AGTCGGAATT GCTA
//

Priloga E

Dolžina genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debelih *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka

(a) Dolžina genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debela *Bacteroidetes*, ki naseljujejo prebavni trakt živali in človeka

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Dolžina genov, ki kodirajo rRNA [b]		
				16S	23S	5S
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	638R	1533, 1533, 1533, 1533, 1533, 1533, 1533	2827, 2828, 2827, 2827, 2826	150, 97, 150, 150, 150, 150, 130
			NCTC 9343	1533, 1533, 1533, 1533, 1533, 1533	2827, 2827, 2826, 2826, 2826, 2826	113, 151, 151, 151, 151, 151, 151
			YCH46	1533, 1533, 1533, 1533, 1533, 1533	2827, 2827, 2826, 2826, 2826, 2827	113, 151, 151, 151, 151, 151, 151
		<i>salanitronis</i>	DSM 18170	1519, 1519, 1519, 1520, 1517, 1518	2877, 2875, 2877, 2877, 2878, 2878	108, 108, 108, 108, 108, 108
		<i>thetaiotaomicron</i>	VP1-5482	1380, 1482, 1482, 1483, 1483	2653, 2653, 2653, 2654, 2654	34, 34, 34, 34, 34
		<i>vulgatus</i>	ATCC 8482	1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510	2801, 2798, 2801, 2829, 2801, 2801, 2704	151, 154, 151, 154, 151, 154, 151
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	ATCC 8503	1496, 1494, 1494, 1494, 1496, 1496, 1496	2762, 2769, 2769, 2769, 2762, 2761, 2761	150, 150, 152, 103, 103, 100, 103
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>	TDC60	1520, 1521, 1521, 1520	2897, 2897, 2897, 2897	110, 110, 110, 110
			W83	1475, 1475, 1475	2833, 2834, 2834, 2834	108, 108, 108, 108
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>ruminicola</i>	23	1488, 1488, 1487, 1488	2831, 2831, 2831, 2831	110, 110, 110, 110
<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	<i>shahii</i>	WAL 8301	1552	2871	112

(b) Dolžina genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debela *Firmicutes*, kateri naseljujejo prebavni trakt živali in človeka

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Dolžina genov, ki kodirajo rRNA [b]		
				16S	23S	5S
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	LL3	1538, 1538, 1538, 1538, 1538, 1538	2928, 2928, 2926, 2926, 2926, 2928	115, 115, 114, 115, 114, 114
			TA208	1559, 1559, 1559, 1557, 1557, 1556	2932, 2931, 2931, 2931, 2931, 2932	117, 16, 116, 116, 116, 116
			XH7	1539, 1538, 1538, 1538, 1538, 1538	2927, 2927, 2928, 2928, 2928, 2928,	115, 115, 115, 115, 115, 115
		<i>coagulans</i>	36D1	1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1546, 1542, 1542, 1542	2931, 2931, 2931, 2931, 2931, 2931, 2931, 2931, 2931, 2931	116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	E681	1506, 1506, 1506, 1506, 1506, 1506, 1506, 1506, 1506, 1506	2926, 2925, 2926, 2926, 2926, 2926, 2926, 2926, 2927, 2924, 2926, 2926	117, 117, 117, 117, 117, 117, 117, 116, 117, 117, 117, 117
			M1	1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542	2925, 2925, 2925, 2927, 2924, 2926, 2924, 2925, 2925, 2925	116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Dolžina genov, ki kodirajo rRNA [b]		
				16S	23S	5S
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SC2	1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542, 1542 ,1542, 1542 ,1542	2922, 2925, 2923, 2925, 2921, 2924, 2922, 2922, 2923, 2924, 2922, 2924, 2924	115, 115, 116, 115, 115, 115, 115, 115, 115 ,116, 116, 116, 115
			62	1548, 1548, 1548, 1548	2910, 2910, 2910, 2910	114, 114, 114, 114
			OG1RF	1549, 1549, 1547, 1549	2911, 2911, 2911, 2911	115, 115, 115, 155
			V583	1521, 1521, 1521, 1521	2908, 2908, 2908, 2908	115, 115, 115, 115
			<i>acidophilus</i>	30SC	1574, 1574, 1574, 1574	2896, 2896, 2896, 2896
				NCFM	1571, 1571, 1571, 1571	3050, 3051, 3050, 3048, 1817
			<i>amylovorus</i>	GRL 1112	1574, 1574, 1574, 1574	2896, 2896, 2896, 2896
				GRL 1118	1575, 1575, 1575, 1575	2896, 2897, 2897, 2897
			<i>brevis</i>	ATCC 367	1562, 1562, 1562, 1562, 1562	2917, 2917, 2917, 2917, 2917
			<i>gasseri</i>	ATCC 33323	1578, 1578, 1578, 1578, 1578	2631, 2630, 2630, 2630, 2630, 2630
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		DSM 20016	1568, 1568, 1568,1568,1568, 1568	2922, 2922, 2922, 2922, 2921, 2922
				JCM 1112	1533, 1533, 1533, 1533, 1533, 1533	2921, 2921, 2911, 2911, 2921, 2921
				SD2112	1563, 1564, 1565, 1564, 1564, 1564	2921, 2921, 2911, 2911, 2921, 2921
				ATCC 53103	1573, 1573, 1573, 1573, 1573	2919, 2919, 2919, 2920, 2919
			<i>rhamnosus</i>	GG	1557, 1557, 1557, 1557, 1557	2915, 2915, 2915, 2916, 2915
				Lc 705	1557, 1557, 1557, 1557, 1557	2915, 2915, 2915, 2915, 2915
			<i>salivarius</i>	CECT 5713	1526, 1526, 1526, 1526, 1516, 1516, 1516	2960, 2779, 2883, 2779, 2883, 2779, 2963, 2782, 2789, 2966, 2783, 2963, 2780, 3116
				UCN34	1537, 1537, 1537, 1537, 1537, 1537	2897, 2897, 2897, 2897, 2897, 2897
			<i>galla lyticus</i>	galla lyticus ATCC 43143	1537, 1537, 1537, 1537	2897, 2897, 2897, 2897, 2897
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>pasteurianus</i>		galla lyticus ATCC BAA-2069	1537, 1537, 1537, 1537, 1537, 1537	2897, 2897, 2897, 2897, 2897, 2897, 2897
				ATCC 43144	1537, 1537, 1537, 1537, 1537	2899, 2899, 2899, 2899, 2899
				57.I	1536, 1536, 1536, 1537, 1537, 1536	2898, 2898, 2898, 2898, 2898, 2898
			<i>salivarius</i>	CCHSS3	1536, 1536, 1536, 1536, 1536	2897, 2897, 2897, 2897, 2897
				JIM8777	1536, 1536, 1536, 1536, 1536, 1536	2898, 2898, 2898, 2898, 2898, 2898
				ATCC 824	1510, 1511, 1511, 1520, 1510, 1510, 1511, 1511, 1551, 1551, 1511	2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906
				DSM 1731	1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1550, 1550, 1510	2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906
				EA 2018	1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1510, 1550, 1550, 1510	2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906, 2906
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>				

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Dolžina genov, ki kodirajo rRNA [b]		
				16S	23S	5S
<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	KIST612	1512, 1512, 1512, 1512, 1512	2862, 2862, 2862, 2862, 2862	116, 116, 116, 116, 116, 116
		<i>eligens</i>	ATCC 27750	1518, 1519, 1518, 1518, 1518	2885, 2884, 2558, 2884, 2885	116, 116, 116, 116, 116
		<i>rectale</i>	ATCC 33656	1520, 1520, 1520, 1520, 1520	2882, 2882, 2882, 2882, 2882	116, 116, 116, 116, 116
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>proteoclasticus</i>	B316	1479, 1479, 1479, 1479 ^a 1479, 1479 ^b	2911, 2911, 2911, 2911 ^a 2911, 2911 ^b	119, 119, 119, 119 ^a 119, 119 ^b
		<i>Roseburia</i>	<i>hominis</i>	A2-183	1535, 1535, 1535, 1535	2889, 2889, 2889, 2889
	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>orientis</i>	DSM 765	1448, 1446, 1446, 1446, 1447, 1446, 1446, 1447, 1447	2909, 2909, 2910, 2910, 2910, 2910, 2910, 2909, 2909	116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116, 116
<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>acetoxidans</i>	DSM 771	1558, 1559, 1558, 1559, 1559, 1559, 1559, 1559, 1559, 1559	2934, 2934, 2936, 493, 2976, 2935, 2935, 2976, 2935, 2935, 2932	115, 115, 115, 115, 115, 115, 134, 115, 115
		<i>carboxydivorans</i>	CO-1-SRB	1516, 1519, 1520, 1518, 1518, 1519, 1518, 1815	2936, 2936, 2936, 2934, 2937, 2935, 2936, 2936	117, 117, 117, 117, 117, 117, 117, 117
		<i>kuznetsovii</i>	DSM 6115	1732, 1702, 1697	3094, 3243, 3185	116, 116, 1160
		<i>ruminis</i>	DSM 2154	1519, 1518, 1518, 1518	2936, 2937, 2937, 2937	117, 117, 117, 117
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>albus</i>	7	1499, 1498, 1498, 1498	2833, 2834, 2834, 2833	116, 116, 116, 116
<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>fermentans</i>	DSM 20731	1544, 1544, 1544, 1544, 1544, 1544	2902, 2903, 2903, 2902, 2903, 2902	115, 115, 115, 115, 115, 115
<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	DSM 2008	1550, 1550, 1550, 1551	2932, 2932, 2932, 2932	114, 114, 115, 114

Oznaki:

^a Kromosom.

^b Kromid.

Priloga F

Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debla *Bacteroidetes* in *Firmicutes*, ki naseljujejo debelo črevo

(a) Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debla *Bacteroidetes*, ki naseljujejo debelo črevo

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Vir
				16S	23S	5S	
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	638R	7	5	7	Namavar in sod. (1989)
			NCTC 9343	6	6	7	
			YCH46	6	6	7	
		<i>thetaiotaomicron</i>	VP1-5482	5	5	5	
		<i>vulgatus</i>	ATCC 8482	7	7	7	
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	ATCC 8503	7	7	7	Lathrop in sod. (2011)
<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	<i>shahii</i>	WAL 8301	1	1	1	Kulagina in sod. (2012)

(b) Število genov, ki kodirajo ribosomsko RNA bakterijskih sevov iz debla *Firmicutes*, kateri naseljujejo debelo črevo

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Vir
				16S	23S	5S	
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	62	4	4	4	Huycke in sod. (2002)
			OG1RF	4	4	4	
			V583	4	4	4	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	30SC	4	4	4	Lidbeck in sod. (1991)
			NCFM	4	5	4	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>amylovorus</i>	GRL 1112	4	4	4	Konstantinov in sod. (2004)
			GRL 1118	4	4	4	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSM 20016	6	6	6	Fabia in sod. (1993)
			JCM 1112	6	6	6	
			SD2112	6	6	6	
<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	KIST612	5	5	6	Wang in sod. (1996)

Družina	Rod	Vrsta	Sev	Št. genov, ki kodirajo rRNA			Vir
				16S	23S	5S	
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>	<i>eligens</i>	ATCC 27750	5	5	6	Lopez-Siles in sod. (2012)
		<i>rectale</i>	ATCC 33656	5	5	5	Wilson in Blitchington (1996)
<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>orientis</i>	DSM 765	9	9	9	Zinkevich in Beech (2000)
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>acetoxidans</i>	DSM 771	10	11	9	Gibson in sod. (1990)
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>albus</i>	7	4	4	4	Kopecný in sod. (2004)
<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Acidaminococcus</i>	<i>fermentans</i>	DSM 20731	6	6	6	Smith in sod.(2003)