

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lenart SENIČAR

**OVREDNOTENJE 5' NEPREVEDENIH REGIJ mRNA PRI
INICIACIJI TRANSLACIJE BAKTERIJE**

Prevotella bryantii TC1-1

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lenart SENIČAR

**OVREDNOTENJE 5' NEPREVEDENIH REGIJ mRNA PRI
INICIACIJI TRANSLACIJE BAKTERIJE
Prevotella bryantii TC1-1**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF DIFFERENT 5' UTR ON INITIATION OF
TRANSLATION IN *Prevotella bryantii* TC1-1
GRADUATION THESIS
University studies**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Skupine za molekularno genetiko Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Tomaž Accetto ter za recenzentko prof. dr. Darja Žgur Bertok.

Mentor: doc. dr. Tomaž Accetto

Recenzentko: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Lenart Seničar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25 + 577.217 (043) = 163.6
KG	<i>Prevotella bryantii</i> / iniciacija translacije/ ribosomalni protein S1/ 5' konec neprevedene regije/ plazmidi/ molekularna genetika
AV	SENIČAR, Lenart
SA	ACCETTO, Tomaž (mentor)/ ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2013
IN	OVREDNOTENJE 5' NEPREVEDENIH REGIJ mRNA PRI INICIACIJI TRANSLACIJE BAKTERIJE <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 57 str., 12 pregl., 17 sl., 3 pril., 37 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Deblo <i>Bacteroidetes</i> po večini ne koristi Shine-Dalgarnovega zaporedja pri iniciaciji translacije kot na primer deblo <i>Proteobacteria</i> , ampak obligatno koristi ribosomalni protein S1, ki z vezavo 30S podenote in mRNA hkrati omogoča iniciacijo translacije. Proučevali smo vpliv bazne sestave neprevedenega zaporedja pred start kodonom, ki je vezavno mesto za protein S1. Z elektroporacijo smo vnesli in izrazili metilirano rekombinantno plazmidno DNA, ki je nosila spremembe v 5' neprevedenem delu gena za nespecifično nukleazo <i>NucB</i> v bakterijo <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1 debla <i>Bacteroidetes</i> . Merili in primerjali smo proizvedeno količino imunodetektiranega proteina pri tako nastalih sevih. Ker pa lahko na ta rezultat vplivajo še ponovna iniciacija, različne stopnje transkripcije, tvorba sekundarnih struktur v območju 20 nukleotidov pred start kodonom in mutacije v nukleotidnem zaporedju, smo dodatno priredili 5' konec s stop kodonom, izvedli rRT-PCR, zaporedje sekvencirali in sekundarne strukture preverili z algoritmom mFOLD. Sevi, ki so vsebovali 5' neprevedeno regijo z večino baznih parov AT so proizvedli največ reporterskega proteina in sklepamo, da je bila iniciacija translacije bolj uspešna kot pri ostalih sevih. Bazna sestava med -13 in -8 mestom ni imela vpliva. Pokazalo se je pa tudi, da protein S1 verjetno ne razlikuje med gvaninom in citozinom.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDC 579.25 + 577.217 (043) = 163.6
CX	<i>Prevotella bryantii</i> / initiation of translation/ ribosomal protein S1/ 5' UTR/ plasmids/ molecular genetics
AU	SENIČAR, Lenart
AA	ACCETTO, Tomaž (supervisor)/ ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2013
TI	IMPACT OF DIFFERENT 5' UTR ON INITIATION OF TRANSLATION IN <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 57 p., 12 tab., 17 fig., 3 ann., 37 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The phylum <i>Bacteroidetes</i> on the most part do not use the Shine-delgarno sequence, but rely on the ribosomal protein S1, who binds the 30S subunit and the mRNA at the same time and thus initiates translation. We investigated the influence of base composition in the untranslated regionof the gene <i>nucB</i> , which encodes a nonspecific nuclease. Via electroporation we introduced and then expressed recombinant methylated plasmids with different 5' UTR,, into <i>Prevotella bryantii</i> TC1-1, a member of the phylum <i>Bacteroidetes</i> . The mechanism of transation initiation here does not, among other things, rely on the interaction between SD/antiSD but solely on the ribosomal protein S1. We measured and compared the imundetected protein and excluded the influence of reinitiation, different levels of transcription, secondary structures of mRNA in the region up to 20 nt before the start kodon and mutations with an added stop kodon in the 5 prime end of the gene, rRT-PCR, sequencing and running the mFOLD algorithm on the critical area. The results show that the constructs with more adenine and thymine initiate more frequently then those with guanine and cytozine. Base composition between the sites -13 and -8 did not have an impact. The mechanism does not differentiate however between constructs whose guanine bases were changed to citozine.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	1
1.3 CILJI NALOGE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 <i>PREVOTELLA BRYANTII</i>	3
2.1.1 <i>Bacteroidetes</i>.....	3
2.1.2 <i>Prevotella</i>.....	4
2.2 INICIACIJA TRANSLACIJE PRI PROKARIONTIH.....	5
2.2.1 Mehанизem iniciacije.....	5
2.2.2 Ribosom.....	6
2.2.3 Faktorji iniciacije.....	7
2.2.4 Strukturni elementi mRNA, ki vplivajo na iniciacijo translacije.....	7
2.2.5 Ribosomski protein S1.....	8
2.2.6 Skupina bakterijskih debel z delajočim proteinom S1	10
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Uporabljen prenosljivi vektor pRH3.....	12
3.1.2 Konstrukti.....	13
3.1.3 Gojišča.....	14
3.1.3.1 LB (Lysogeny broth).....	14
3.1.3.2 M2.....	15
3.1.3.3 M330.....	15
3.1.3.4 Hranilni agar.....	15
3.1.4 Kemikalije.....	16

3.1.5 Pufri in raztopine	17
3.1.6 Naprave.....	19
3.2 METODE.....	20
3.2.1 Zastavljeni eksperiment.....	20
3.2.2 Priprava kompetentnih celic <i>E.coli</i> in transformacija.....	22
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	22
3.2.4 Izolacija plazmidne DNA.....	23
3.2.5 Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo.....	24
3.2.6 Agarozna gelska elektroforeza.....	24
3.2.7 Defosforilacija oz. priprava vektorja za ligacijo.....	24
3.2.8 Ligacija.....	25
3.2.9 Čiščenje raztopin DNA.....	25
3.2.10 Preverjanje usmerjenosti vključka.....	25
3.2.11 Kvantifikacija vzorca na fotografiji agaroznega gela ali membrane.....	26
3.2.12 Priprava celičnega lizata.....	26
3.2.13 <i>In vitro</i> zaščita DNA proti restriktivskem encimu <i>Pbr</i>TI iz <i>P. bryantii</i> TC1-1..	27
3.2.14 Elektroporacija <i>P. bryantii</i> TC1-1.....	27
3.2.15 Preverjanje nukleazne aktivnosti supernantanta kulture <i>P. bryantii</i> TC1-1....	27
3.2.16 Priprava gela za poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-Page).....	28
3.2.17 Priprava vzorca za SDS-Page.....	29
3.2.18 SDS-Page.....	29
3.2.19 Prenos Western.....	29
3.2.20 Imunodetekcija.....	30
3.2.21 Izolacija RNA.....	30
3.2.22 Ugotavljanje čistosti in koncentracije RNA.....	31
3.2.23 Čiščenje vzorca RNA z DNazo.....	31
3.2.24 Obratno prepisovanje.....	32
3.2.25 Izvedba PCR v realnem času	32
3.2.26 Sekvenciranje.....	33
3.2.27 Računanje relativne količine mRNA poročevalnega proteina <i>NucB</i> v posameznih sevih.....	34

4 REZULTATI.....	36
4.1 KLONIRANJE GENA <i>nucB</i>	36
4.2 PREVERJANJE ZAŠČITENOSTI DNA.....	39
4.3 ELEKTROPORACIJA <i>P. BRYANTII</i>	40
4.4 NUKLEAZNA AKTIVNOST SUPERNATANTA.....	41
4.5 UGOTAVLJANJE RELATIVNE KOLIČINE PROIZVEDENEGA PROTEINA	42
4.6 SEKVENCIRANJE.....	43
4.7 SEKUNDARNE STRUKTURE.....	43
4.8 UGOTAVLJANJE STOPNJE TRANSKRIPCIJE POREČEVALNEGA GENA <i>nucB</i>	44
4.8.1 Izolacija RNA.....	44
4.8.2 Obratno prepisovanje.....	46
4.8.3 Ocena relativnega izražanja reporterskega gena <i>nucB</i>	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.1.1 Aktivnost supernatanta.....	48
5.1.2 Ugotavljanje relativne količine proizvedenega reporterskega proteina <i>NucB</i> ...48	48
5.1.3 Izolacija RNA.....	49
5.1.4 Ugotavljanje relativne ekspresije proteina.....	49
5.1.5 Normalizacija količine proteina s količino mRNA.....	49
5.2 SKLEPI.....	50
6 POVZETEK.....	51
7 VIRI.....	52
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Ribosomski protein S1 (Sengupta in sod., 2001; Hajnsdorf in Boni, 2012).....	9
Slika 3: Shema dela.....	21
Slika 4: Gelska elektroforeza očiščene DNA gena <i>nucB</i> s spremenjenimi 5' konci neprevedene regije nastale s hfPCR	36
Slika 5: Gelska elektroforeza prenosnega vektorja pRH3 izoliranega iz <i>E.coli</i> brez vključkov.....	37
Slika 6: Gelska elektroforeza izolacije plazmidne DNA transformant <i>E.coli</i>	38
Slika 7: Preverjanje zaščitenosti rekombinantne DNA sevov 1201 C, 1201 D, 1201 E pred restriktijsko modifikacijskim sitemom <i>P. bryantii</i> TC1-1 s cepitvijo z endonukleazo Sau3AI.	39
Slika 8: Preverjanje elektroporacije s cepitvijo z endonukleazo <i>PstI</i> plazmidne DNA izolirane iz elektroporiranih rekombinantnih celic <i>P. bryantii</i> TC1-1 sevov.....	40
Slika 9: Nukleazna aktivnost supernatantov sevov 1201 C, 1201 D in 1201 E.....	41
Slika 10: Membrana PVDF z imunodetektiranim proteinom <i>NucB</i>	42
Slika 11: Prikazano območje uporabljeno za kvantifikacijo reporterskega proteina.....	43
Slika 12: Poravnavo zaporedij vzorcev 1201 C, 1201 D, 1021 E in 1201.....	43
Slika 13: Predvidena enotna sekundarna struktura 5' konca neprevedene regije sevov 1201, 1201 C, 1201 D in 1201 E.....	44
Slika 15: Preverjanje obratnega prepisovanja RNA v cDNA z gelsko elektroforezo produktov PCR pri katerih smo uporabili tarči za gen <i>nucB</i> in 16S cDNA.....	46
Slika 16: Grafični prikaz izmerjene količine fluorescence pri rtPCR.....	47
Slika 17: Talilna krivulja vseh vzorcev pri rtPCR.....	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki.....	14
Preglednica 2: Sestavine, splošne koncentracije oziroma količine za PCR in le-te preračunane za tipično reakcijo z volumnom 20 µL	23
Preglednica 3: Uporabljene temperature, čas in ponovitve posameznih ciklov.....	23
Preglednica 4: Reakcijske mešanice za ligacijo.....	25
Preglednica 5: Sestavine ločevalnega in nabijalnega gela za SDS-page.....	28
Preglednica 6: Sestavine osnovne zmesi za obratno prepisovanje.....	32
Preglednica 7: Shema PCR v realnem času.....	33
Preglednica 8: Relativna količina proizvedenega proteina <i>NucB</i>	42
Preglednica 9: Meritve in izračuni čistosti ter koncentracije RNA.	45
Preglednica 10: Relativna ekspresija gena <i>nucB</i>	47
Preglednica 11: Relativna količina proteina <i>NucB</i> normalizirana s količino mRNA.....	50
Preglednica 12: Relativna količina proizvedenega proteina <i>NucB</i> II. Normaliziran je le vzorec 1201 D.....	50

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Rezultati sekvenciranja gena *nucB* vseh treh sevov

PRILOGA B: Podatki relativnih izražanj reporterskega gena po posameznih dnevih vseh treh sevov

PRILOGA C: Delni izračuni in izpiski programa REST

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

30S	Mala prokariotska ribosomska poenota
50S	Velika ribosomska podenota
APS	Amonijev perklor sulfat
AT	Bazni par med adeninom in timinom
bp ali b	Bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
CFU	(ang. colony forming units)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
<i>E. coli</i>	Bakterija <i>Escherichia coli</i>
fMet-tRNA	Iniciatorska tRNA
GC	Bazni par med gvaninom in citozinom
IF	Iniciatorski faktor
λ DNA	DNA bakteriofaga Lambda
MQ	Voda mili Q
mRNA	Informacijska RNA (ang. messenger RNA)
nt	Nukleotid, enota dolžine enovarižnega zaporedja
NTC	Vzorec brez tarče
OD _{654 nm}	Optična gostota (ang. optical density)
<i>P. bryantii</i>	Bakterija <i>Prevotella bryantii</i>
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
PUL	Genski lokus s proteini za pridobivanje energije iz polisaharidov (ang. polysaccharide utilisation locus)
RBS	Zaporedje, ki ga ribosom z vezavo zaščiti pred nukleazami (ang. ribosome binding site)
RNA	Ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
rRNA	Ribosomska RNA (ang. ribosomal RNA)
rrPCR	Dvostopenjska PCR v realnem času (obratno prepisovanje in rPCR)
SDS	Natrijev dodecil sulfat (ang. Sodium dodecyl sulfate)
SD	Shine-Dalgarnovo zaporedje
Sus	Genski lokus s proteini za pridobivanje energije iz škroba (ang. starch utilisation system)
Str	Streptomycin
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tmRNA	(ang. transfer messenger RNA)
tRNA	Prenašalna RNA (ang. transfer RNA)
ε	Ekstincijski koeficient
VFA	Lahko-hlapne maščobne kisline (volatile fatty acids)
SDS-Page	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

S sekvenciranjem stotin bakterijskih genomov je postalo jasno, da pri velikem, po nekaterih navedbah skoraj polovičnem deležu vseh genov iniciacija translacije ne poteka po klasičnem mehanizmu, ki vključuje interakcijo s Shine-Dalgarnovo sekvenco (SD), ker te pred anotiranim start kodom ni. Izkazalo se je celo, da nekatera velika in pomembna bakterijska debla, npr. *Bacteroidetes*, ne uporabljajo tega mehanizma iniciacije, temveč pri njih po vsej verjetnosti iniciacija teče izključno preko vezave ribosomskega proteina S1 na 5' neprevedene dele mRNA. Za anaerobno vampno vrsto bakteroidet *Prevotella bryantii* so pokazali, da po vsej verjetnosti ni zmožna uporabljati Shine-Dalgarnove sekvence in je zato iniciacija translacije veliko bolj občutljiva za sekundarne strukture v 5' neprevedeni regiji mRNA kot pa pri *Escherichia coli*. Inhibicijo s sekundarnimi strukturami so potrdili do 20. nukleotida pred start kodonom. Vezavna mesta za ribosomski protein S1 so bogata z adeninom in uracilom in prav tako obogatitev lahko zasledimo v sekvenčnih logih 5' neprevedenih sekvenc genov v bakteroidetah.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Če je obogatitev z adeninom in uracilom v 5' neprevedenih delih mRNA res vezavno mesto za ribosomski protein S1, bi se morala spremenjena bazna sestava tega dela mRNA v odsotnosti sekundarnih struktur odraziti pri iniciaciji translacije in posledično količini reporterskega proteina.

1.3 CILJI NALOGE

- Pripraviti tri plazmidne konstrukte s spremenjeno 5' neprevedeno regijo reporterskega gena *nucB*, jih vnesti in izraziti v *Prevotella bryantii* TC1-1.
- Predvideti odsotnost sekundarnih struktur v 5' neprevedenih delih mRNA nastalih iz plazmidnih konstruktov v *Prevotella bryantii* TC1-1 z algoritmom mFOLD.
- Preveriti ali bazna sestava 5' neprevedenih delov mRNA v odsotnosti sekundarnih struktur vpliva na iniciacijo translacije v *Prevotella bryantii*. To bomo storili s primerjavo vzorčnih količin proteina *NucB* s količino proteina pri referenčnem sevu *Prevotella bryantii* TC1-1, ki vsebuje nespremenjeno 5' neprevedeno regijo, ki izvira iz gena *P. intermedia* 17 PINA_1201.
- Potrditi, da je spremenjena količine proteina res posledica vnešenih sprememb v zaporedju nukleotidov (preverjanje sekvence vključkov, meritev mRNA gena *nucB* v narejenih rekombinantnih sevih.)

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREVOTELLA BRYANTII

Bacteroidetes (deblo)

Bacteroidia (razred)

Bacteroidales (red)

Prevotellaceae (družina)

Prevotella (rod)

Prevotella bryantii TC1-1

2.1.1 *Bacteroidetes*

Bacteroidetes se delijo na štiri razrede: *Bacteroidia*, *Flavobacteria*, *Sphingobacteria*, *Cytophagia*. Barvajo se po Gramu negativno. Pri tako obsežnem deblu najdemo anaerobne (*Bacteroidia*) in aerobne predstavnike (*Flavobacteria*). Lahko so nepremični ali se premikajo s flageli oziroma s polzenjem. Velikosti genoma segajo od 0,3 Mb pri obligativnih simbiontih do 9,1 Mb pri bakterijah iz okolja. Dokazali so jih skoraj povsod v zemlji, sladki in slani vodi, sedimentih in mikrobiotah živali in ljudi. V prebavnem traktu večinoma najdemo *Bacteroidia*, medtem ko so v okolju pogostejši ostali trije razredi (Thomas in sod., 2011).

Njihova značilna lastnost je razgradnja kompleksnih organskih snovi. To jim daje pomembnost pri (1) kroženju ogljika v naravi, saj razgrajujejo odmrlo živo snov, (2) jim omogoča patogenost, ker so zmožni razgraditi telesu lastne snovi. Hkrati je pa tudi poglaviten razlog za (3) mutualističen odnos v prebavnem traktu živali in ljudi, kjer z dodatno razgradnjo hrane priskrbijo 7-10 % dodatnega izkoristka pri omnivorih in 50 % pri prežvekovalcih. Butirat, eden izmed končnih produktov fermentacije pomaga pri zdravi in nadzorovani rasti celic v prebavnem traktu. Bakterije sodelujejo tudi pri metabolizmu žolča in pri razstrupljanju. Posamezni sevi imajo tudi do petkrat večji repertoar glikoziltransferaz in glikozilaz kot ostali mikroorganizmi, na primer *Bacteroides thetaiomicron* jih ima 272, kar je 18 % celotnega genoma, namesto 1-3 %, ki predstavljajo povprečno vrednost. Zapisi za te encime so združeni v genskih lokusih, poimenovanih polysaccharide utilisation loci

(PULs). Prvi odkriti, modelni primer, je lokus Sus (Starch utilisation sistem) pri *B. thetaiomicron*, osem genov, ki omogočajo vezavo, cepitev in prenos oligosaharidov v celico. Takšno fermentativno raznolikost je to bakterijsko deblo doseglo z genomskim preurejanjem, podvajanjem in horizontalnimi prenosi znotraj in zunaj debla. Filogenetske raziskave nakazujejo, da je prišlo celo do prenosa gena iz druge domene življenja, arhej. Bolj pogosti so prenosi raznih PULov znotraj debla. Ugotovili so na primer, da jih bakterije v prebavilih pridobivajo preko kontaminirane hrane od okoljskih vrst. Pojavi se zabaven citat iz članka iz katerega navajam: »Tell me what you eat, I will tell you what your bacteria can do« (Thomas in sod., 2011).

2.1.2 *Prevotella*

Odkril jih je Marvin P. Bryant, so anaerobne vampne bakterije, ki kot glavni fermentativni produkt proizvajajo sukcinat, in jih uvrstil v rod *Bacteroides*, s katerimi jih druži anaerobnost, negativno barvanje po gramu in nesporogenost, a so na podlagi občutljivosti te skupine za žolčne soli, slabši saharolitičnosti in odsotnosti glukoze-6-fosfat dehidrogenaze in 6-fosfoglukonat dehidrogenaze, ustvarili nov rod (Shah in Collins, 1990). Sedaj so pa po Bergeyu klasificirane kot ena izmed petih družin v edinem redu *Bacteroidales* razreda *Bacteroidia*, debla *Bacteroidetes*. Torej družine so *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae* in *Marinilabiliaceae* (Whitman in sod., 2012) Tipski sev je *Prevotella melaninogenica*. Uporabljena vrsta sodi v skupino prevotel večinoma najdeno v vampu prežvekovalcev. V tej skupini so štiri vrste: *P. ruminicola*, *P. brevis*, *P. albensis* in *P. bryantii*. Tipski sev uporabljeni vrste je *P. bryantii* B₁4. Mi smo uporabili *P. bryantii* TC1-1, ki za razliko od B₁4 proizvaja precej manjšo količino lastnih izvenceličnih DNaz (Avguštin in sod., 1997). Pomembna prednost TC1-1 je tudi poznan restriktijsko modifikacijski sistem tipa II, *Pbr*TI, izoshizomera *Sau*3AI (Accetto in sod., 2005) in razvita metoda vnosa genov v ta sev (Accetto in Avguštin, 2007).

V nativnem mikroskopskem preparatu so nepremični pleomorfni bacili. Za rast večine vrst sta potrebna hemin in provitamin K. Njihov temperturni optimum je 37 °C. Koncentracija NaCl postane inhibitorna pri 6,5 %. Izolirali so jih že iz človeške ustne votline, abscesov na koži, zemeljskih vzorcev, prebavnem traktu rastlinojedov in vsejedov, kjer je na primer pri

človeku rod *Prevotella*, za rodom *Streptococcus*, drugi najpogostejši predstavnik v grlu in požiralniku. Nekaterih ne moti niti kislo okolje želodca, kjer sledijo *Helicobacter pylori* in ponovno rodu *Streptococcus* (Thomas in sod., 2011). Z do 70 % so tudi večinski predstavnik vampa prežekovalcev (Purushe in sod., 2010) Njihova gospodarska pomembnost se kaže z vlogo pri delovanju in vzdrževanju zdravega vampa. Z naravno kompeticijo omejujejo *Streptococcus bovis*, ki je eden izmed glavnih povzročiteljev vampne acidoze. Lahko-hlapne maščobne kisline (VFA), ki so poleg vira energije in prekurzorjev za maščobne kisline, glukozo ter ketonska telesa v metabolizmu goveda tudi del puferskega sistema (Hobson, 1997). VFA se skozi steno vampa izmenjajo z natrijevim bikarbonatom iz krvi in s tem dopolnijo pufersko kapaciteto natrijevega bikarbonata iz sline. (Owens in sod., 1998) Hkrati pa tudi same VFA predstavljajo pomemben pufer (Gh in sod., 1979). Zanimive so tudi v zdravstvu, ker je okvirno 60 % izolatov patogenih (Purushe in sod., 2010).

2.2 INICIACIJA TRANSLACIJE PRI PROKARIONTIH

Iniciacija translacije je proces, s katerim se prične prevajanje mRNA v peptide. Prevajanje zajema še elongacijo, terminacijo in obnavljanje ribosoma. Translacija se prične že med transkripcijo, v nekaj sekundah, ko prepisana mRNA postane dostopna. Iniciacija je tudi najbolj kontroliran del translacije in čeprav je regulacija transkripcije primarni mehanizem pri odgovoru na spremembe v okolju, je regulacija iniciacije hitrejša in s tem pomembna. Uravnana je s pomočjo cis- in trans- delujočih RNA zaporedij, z vezavo proteinov na mRNA, s spremembami temperature in pri policistroneh mRNA tudi s ponovno inciacijo. Ti mehanizmi večinoma delujejo na podlagi tvorbe ali odstranitve sekundarnih struktur v RBS. Pri inciaciji sodelujejo: obe (1) podenoti ribosoma (po stopnji sedimentacije pri prokariontih poimenovani 30S in 50S) (2) faktorji iniciacije (IF1, IF2 in IF3), (3) initiatorska RNA (fMet-tRNA) in (4) mRNA (Laursen in sod., 2005).

2.2.1 Mehanizem iniciacije

Klasični mehanizem nam pravi, da se na disociirano 30S podenoto v neznanem vrstnem redu vežejo IF2, fMet-tRNA in mRNA. Ribosomska podenota 30S je v tako imenovanem

»standby« mestu (de Smit in van Duin, 2003). Informacijska RNA je na ribosomsko podenoto vezana preko le tretje podenote proteina S1 v neposredni bližini start kodona. Nato se z vezavo preostalih regij proteina S1 podrejo sekundarne strukture v RBS. Ribosomska podenota se nato lahko poravna na mRNA, tako da pride do interakcije med SD in antiSD ter med kodonom in antikodonom na mestu ribosoma P. Heliks 44 stabilizira to povezavo z izbočenjem baz in povzroči konformacijsko spremembo, zasuk glave in ramena 30S podenote proti reakcijskemu centru v tako imenovano zaprto obliko. Odcepita se IF1 in IF3. Nato naleže 50S podenota in IF2 se konformacijsko spremeni s hidrolizo vezanega GTP, kar povzroči njegovo odcepitev. Sedaj sta tRNA in start kodon poravnana v peptidiltransferaznem delu 50S podenote. Prične se elongacija (Laursen in sod., 2005).

2.2.2 Ribosom

Ribosom je sestavljen iz rRNA in ribosomskih proteinov. Sestavi se s pomočjo sekundarnih struktur rRNA, katere se med sabo povezujejo z Mg²⁺-mostovi med negativno nabitimi fosfatnimi skupinami, z motivom »A minor«, kjer se adenin izboči in z vodikovimi vezmi veže mali graben sosednje dvostranske RNA in z interakcijami med ribosomskimi proteini in rRNA, ki se vežejo na fosfat-sladkorno hrbtenico zaporedja, torej ne prepoznajo določenega zaporedja, ampak obliko verige, kateri se prilagodijo in ji zapolnijo vmesne prostore. Na ribosому pride tRNA v stik z mRNA na treh mestih, poimenovanih A, P in E. Torej mesto, kjer Aminoacilirana-tRNA vstopi, mesto, kjer se na to tRNA prenese dosedanji peptid in mesto, kjer tRNA brez aminokisline zapusti ribosom. Velika podenota (50S) je katalitičen del. Ima peptidil transferazni center. Mala podenota (30S) skrbi za prepoznavanje pravilne tRNA za trenutni kodon pri elongaciji, »decoding«. Pravilni antikodon na tRNA v mestu A ribosoma povzroči izbočenje baz A1492 in A1493 v heliku 44, ki se, po principu motiv »A minor«, vežejo v mali graben prvega in drugega mesta antikodona. S tem stabilizirajo povezavo in povzročijo struktурno preoblikovanje podenote 30S. Izboči se baza G530, ki z vezavo na drugo in tretje mesto antikodona dodatno stabilizira povezavo. Tu se pokaže tudi degeneriranost genetskega koda, ko ujemanje tretje baze v kodonu ni potrebno, ker se bazi v heliku 44 povežeta le s prvima dvema mestoma (Laursen in sod., 2005).

2.2.3 Faktorji iniciacije

V nasprotju z elongacijo, pri iniciaciji vstopi tRNA na P mesto ribosoma, za kar so zaslužni IF. Pri prokariontih so trije. IF1 je aktivator, ki blokira mesto A na ribosomu in s tem vodi fMet-tRNA na mesto P, stimulira IF3 in IF2 in njegova vezava povzroči konformacijsko spremembo v ribosomu. IF2 je vezan na iniciatorsko tRNA in usmerja njen natezanje na ribosomske podenote 30S. Varuje estersko vez na fMet-tRNA pred spontano hidrolizo in pred vezavo fMet-tRNA na faktor elongacije, ki bi jo uporabil v drugi stopnji translacije. Pomembna je pa tudi GTPazna aktivnost IF2, ki povzroči konformacijske spremembe v 50S ribosomalni podenoti. Je edini IF, ki ima močno afiniteto do obeh ribosomalnih podenot. Vpletjen je tudi v prevajanje mRNA brez 5'UTR, torej mRNA, ki se prične s start kodonom. Vloga IF3 je disociacija obeh ribosomalnih podenot. Vezan na podenoto 30S blokira vezavno mesto za 50S podenoto. Preverja povezavo kodon/antikodon in pospešuje disociacijo nepravilne iniciatorske tRNA, Z disociacijo nasprotuje tudi iniciaciji mRNA, ki se pričnejo s start kodonom (leaderless mRNA) in tistih, ki ne koristijo AUG. Ni ubikviaren kot druga dva. Pospešuje recikliranje ribosoma (Laursen in sod., 2005).

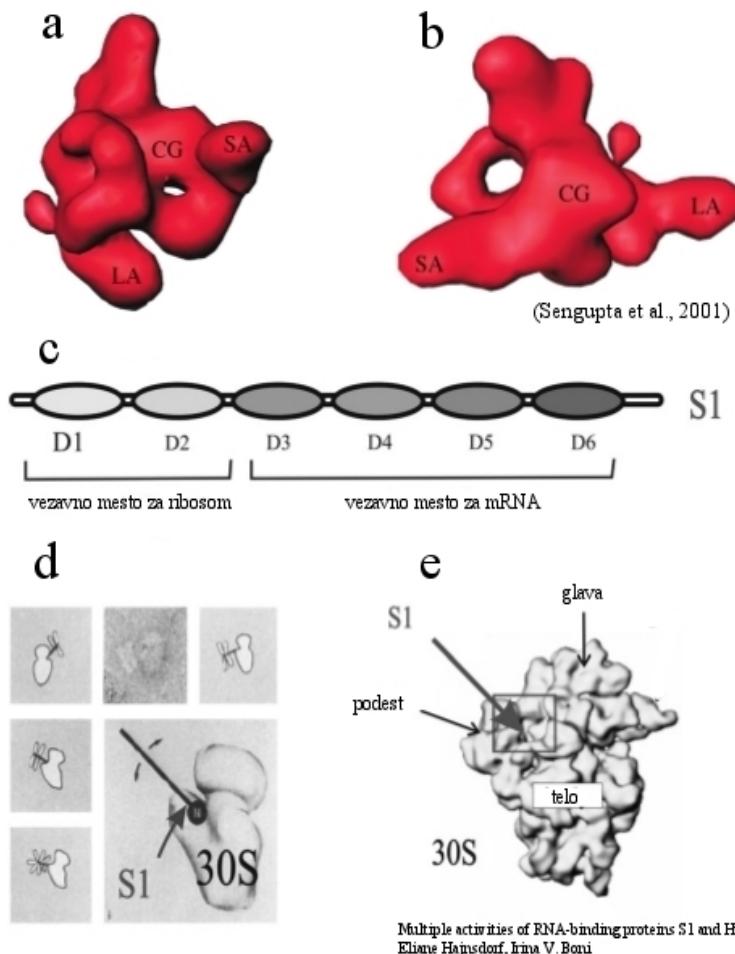
2.2.4 Strukturni elementi mRNA, ki vplivajo na iniciacijo translacije

Le-ti so v mestu RBS, torej delu mRNA, ki je z ribosomom pri iniciaciji zaščitena pred nukleazami. Pomemben je izbrani **start kodon**. Prediniciacijski kompleks je najstabilnejši s kodonom AUG. V uporabi so pa tudi GUG, UUG, AUU. Interakcija kodon-antikodon je v tem primeru šibkejša in iniciacija posledično redkejša. Ribosomalna podenota s pripadajočimi proteinimi se dodatno poravnata z vezavo **Shine-Dalgarno zaporedja** (SD), s komplementarnim zaporedjem na 3' koncu 16S rRNA. Pomembni sta oddaljenost SD od start kodona, saj se z vezavo ribosom ne le ustavi, ampak tudi poravnata mesta P s start kodonom in sama dolžina SD, kjer več kot običajnih 4-5 nt lahko doprinese boljšo iniciacijo pri močnejših sekundarnih strukturah ali neuporabi AUG kodona. Pomembno vlogo imajo tudi močnejše **sekundarne strukture**, ki lahko preprečijo iniciacijo, medtem ko lahko v njihovi odsotnosti iniciacija poteče tudi brez SD zaporedja (Kozak, 2005).

Nakagawa in sod. (2010) menijo, da odsotnost SD ni tako redka, kot je bilo sprva predpostavljeno. Interakcija SD/antiSD ni vsesplošen mehanizem, kakor nakazujejo modelni organizmi. S pregledovanjem zaporedij iz 17 debel bakterij in arhej so ugotovili, da je odstotek genov z SD zelo različen med posameznimi vrstami, ampak ohranjen po posameznih deblih. Tako so izstopile posamezne skupine, ki imajo preračunano zelo nizek odstotek genov z zaporedjem SD in niso v tesni filogenetski povezavi. Vse podatke so primerjali tudi s funkcionalnostjo **ribosomskega proteina S1 (S1)** po posameznem deblu (Salah in sod., 2009) in pojavile so se štiri skupine, ki nakazujejo ali izključno uporabo proteina S1 namesto SD, ali obratno, ali uporabo obeh, ali pa nedoločljivo, kjer skupina ne uporablja ne proteina S1, ne zaporedja SD. V zadnji skupini najdemo debla, ki imajo veliko število »leaderless« mRNA in cianobakterije, ki z nizko frekvenco genov z zaporedjem SD in nefunkcionalnim S1 proteinom nakazujejo na še neznan mehanizem.

2.2.5 Ribosomski protein S1

Ribosomski protein S1 je pri *E. coli* je velik 68 kDa. Z ribosomom ima šibko vezavo, zato ga ne najdemo vedno vezanega na ribosom v citoplazmi, a je nujno potreben za iniciacijo translacije (Sørensen in sod., 1998). Večina ribosomalnih proteinov je bazičnih, S1 je kisel. In kar je bistveno za njegovo funkcionalnost, kot edini ribosomalni protein je spodoben vezati mRNA. S prvo dvema domenama se veže na ribosom. S preostalimi štirimi pa interagira z enoverižnim zaporedjem na mRNA. Opazna je preferenca za poli-adenin in poli-uracil mesta. To mu omogoča struktura beta-sodček, kar ga uvršča med proteine, ki vežejo oligonukleotide. Terciarno strukturo teh domen si lahko predstavljamo kot tako imenovani centralni del (CG) z dvema pravokotnima luknjama in dvema izrastkom, ki so ju poimenovali kratka roka (SA) in dolga roka (LA), prikazano na sliki 1 v točkah A in B. Študije so ga postavile v ribosomski podenoti 30S med glavo, podestom in telesom, torej v reakcijski center. V neposredni bližini je tudi heliks 45 iz 16S rRNA.



Slika 1: Ribosomski protein S1 (Sengupta in sod., 2001; Hajnsdorf in Boni, 2012)

a in b sta naris in stranski ris proteina S1. c je shematski prikaz. Pri točkah d in e pa vidimo kje na podenoti 30S se protein S1 nahaja.

Osrednja domena S1 pride v stik z 11 nukleotidi informacijske RNA. Predvidevajo, da lahko s tem določi RBS in mu pripisujejo vlogo pri iniciaciji in elongaciji translacije (Sengupta in sod., 2001). Protein S1 pomaga pri naleganju mRNA na ribosomske podenote 30S in pri rušenju sekundarnih struktur brez potrebe po energiji v obliki adenozin-3-fosfata, ATP. Protein deluje kot ogrodje, na katerem se zaporedje raztegne. Raziskave z optično pinceto so pokazale, da je vezano zaporedje z dolžino 0,5 nm/nt bližje povsem iztegnjenemu zaporedju z 0,59 nm/nt kot pa naključno zviti spirali, ko je zaporedje prosto. Rezultati nakazujejo tudi, da se protein veže postopoma. Torej se najprej podenota S3 veže v trenutno nezvito zaporedje, ki nastane zaradi ravnotežja med enoverižno in v sekundarne

strukture izoblikovano mRNA, »thermal breathing« in s tem stabilizira ta dostopen mehurček v RNA, v tandemu se nato vežeta podenoti S4 in S5, katerima pripisujejo glavno vlogo pri rušenje sekundarnih struktur in na koncu še podenota S6, v kolikor je prisotna (Qu in sod., 2012). Sodeluje tudi pri drugih celičnih procesih, kot je zaščita enoverižne mRNA pred nukleazami in ponekod pri trans-transkripciji kjer pomaga pri asociaciji transfer messenger RNA (tmRNA) z zaustavljenim ribosomom na mRNA in s tem omogoča razgradnjo nepopolnega proteina (Wower in sod., 2013). Dokazali so strukturo domen 4 in 6 in tako razkrili strukturo beta-sodček, ki se pojavlja v vseh ribosomalnih proteinih S1 in zaporedje, s katerim lahko identificirajo vsako od domen. Zaporedja številnih sevov so poravnali in iz njih naredili filogentska drevesa. Ugotovili so, da je šesta domena pogrešljiva pri iniciaciji. Protein so našli v vseh gram negativnih bakterijah, pri gram pozitivnih so le sorodne oblike, katerih vloga še ni pojasnjena, medtem ko ga pri arhejah niso našli. Bakterije so lahko razdelili na štiri skupine. (1) Deblo *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Aquifcae*, *Thermotogae* in *Deinococcus-Thermus*, ki imajo protein iz vsaj 5 pravilnih podenot v pravem vrstnem redu in je verjetno funkcionalen. (2) Deblo *Actinobacteria* s krajšim S1 z ohranjenima prvima dvema domenama, a z neznano peto. Vloga pri iniciaciji translacije je tukaj vprašljiva. (3) Deblo *Firmicutes*, *Tenericutes* in *Cyanobacteria*, ki imajo krajšo obliko proteina in neprepoznavno prvo domeno. (4) Ter deblo *Chloroflexi* in izjema pri *Firmicutes*, razred *Clostridia*, ki ju uvrščamo med drugo in tretjo skupino. Imajo delno prepoznavno prvo domeno, a so izgubili peto. Sklepajo, da je protein arhaičen in počasi, z odcepitvami ali spremembami domen izgublja svojo vlogo (Salah in sod., 2009).

2.2.6 Skupina bakterijskih debel z delajočim proteinom S1

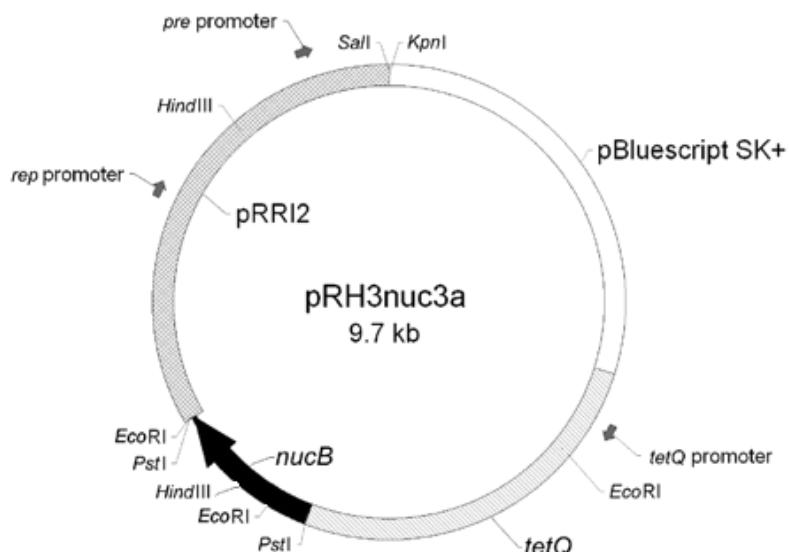
Naš uporabljeni sev, *Prevotella bryantii* TC1-1, je v skupini, ki večinoma pri iniciaciji translacije koristi le protein S1. Sem sodi celotno deblo *Bacteroidetes*, kot poročata Accetto in Avguštin (2011). Z iskanjem sekvenčnih logov (Schneider in Stephens, 1990) v genomskeh zbirkah in z izražanjem različnih konstruktov v *Prevotella bryantii* (Accetto in Avguštin, 2007) sta dognala, da je pri deblu *Bacteroidetes* prišlo do očitnega padca vsebnosti GC parov med mestom -30 in anotiranim start kodonom. Pojavlja se celo med rodovi oziroma družinami ohranjen sekvenčni logo iz adeninov in timinov na -12 oziroma -13 mestu glede na start kodon. V celotnem deblu tudi ni bilo mogoče opaziti sekvenčnega loga, značilnega za zaporedje SD. Kar je več, konstrukti z dodanim in ali spremenjenim zaporedjem SD ne kažejo eksperimentalno določljivega vpliva na iniciacijo. Predvideva se, da je izključno vlogo iniciacije prevzel protein S1, ki veže mesta bogata z AU na mRNA. Izkazalo se je, da je takšen mehanizem bolj občutljiv na sekundarne strukture od mesta -20 do start kodona v primerjavi z *E. coli* (Accetto in Avguštin, 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Uporabljen prenosljivi vektor pRH3

Prenosljivi vektor pRH3 je sestavljen iz pRRI2, kriptičnega plazmida iz *P. ruminicola* 223/M2/7, ki je bil vstavljen v vektor pBluescript SK+. Temu je bil dodan gen *tetQ* iz plazmida pNFD13-2. Odstranjena so mu bila določena podvojena restrikcijska mesta (Daniel in sod., 1995). V tako sestavljen plazmid smo v prepoznavno mesto za restrikcijsko endonukleazo *PstI* vstavili preučevano DNA nastalo s HF PCR in s tako pripravili transkripcijsko fuzijo z genom *tetQ*. Regija pBluescript nam je omogočil podvojevanje v *E. coli* in odpornost proti amplicilinu, medtem ko pRRI2 omogočia podvajanje v *P. bryantii*. Gen *tetQ* poleg selekcijskega markerja, odpornosti proti tetraciklinu, predstavlja tudi inducibilni promotor preučevanega gena. Pomembna lastnost sta tudi restrikcijski mesti v genu *nucB* za restrikcijska encima *EcoRI* na nukleotidnem mestu 488 od pričetka gena in *HindIII* na nukleotidnem mestu 581 od pričetka gena, ki smo ju uporabili pri preverjanju orientacije vključkov v vektor opisano v metodi 3.2.10.



Slika 2: Uporabljeni vektor prenosa pRH3 s prikazanimi funkcionalnimi geni in restrikcijskimi mesti (Accetto in Avguštin, 2007)

3.1.2 Konstrukti

Eksperimentalna razlika med konstrukti je v 5' koncu neprevedene regije vstavljenega gena. Prikazana je v preglednici 1 pri oligonukleotidnih začetnikih 1201C, 1201D in 1201E. V zaporedju je podčrtan **start kodon**. Spremenjene baze so odenbeljene in na mestih med -8 in -19 glede na start kodon. Pomembna funkcionalna dela sta še **stop kodon** in prepoznavno zaporedje za restriktijsko endonukleazo *PstI*, **CTGCAG**. Spremembe v zaporedju smo vnesli pri PCR z na 5' koncu podaljšanimi oligonukleotidnimi začetniki, 1201C, 1201D in 1201E. Torej z začetniki, ki so poleg nalagalnega dela imeli še rep, ki ni hibridiziral s tarčo, a se je vseeno prepisal ob delovanju polimeraze pri verižni reakciji s polimerazo (PCR).

Sicer uniformno, smo spremenili tudi C-konec proteina. Uporabili smo podaljšan obratno smiselni oligonukleotidni začetnik, nnucrhistag, katerega zaporedje je v preglednici 1. Funkcionalna dela sta »histidinski rep« (6 zaporednih kodonov za aminokislino histidin) in dva zaporedna **stop kodona**.

Za primerjavo smo uporabili rekombinantno plazmidno DNA, ki je vsebovala nespremenjeno 5' UTR regijo gena iz divjega tipa *P. intermedia* 17 PINA_1201 (Accetto in Avguštin, 2011). Vzorec smo poimenovali 1201 in ključni del UTR je prikazan v preglednici 1 poleg oligonukleotidnih začetnikov.

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki.

Barvno in slogovno so označenimi funkcionalni deli ter 5' UTR regija seva 1201.

ime	zaporedje
nnucrhistag	GCCGCTGCAG TTATTA ATGATGATGATGATGAGAACCCCCGTTAAG TTTCCAGGCTCTTA
MERILO (relativno na start kodon)	-42 -20 -9 -----*-----*-----*-----*
1201	CTGCAGTAAGTAAAAAAACAAACATATAA ATTAATAGGAGGAA AAGATT TG CACACAA
1201C	GCCG CTGCAG TAAGT AAAAAAACAAACATATAA AGGAGGAGGAGGAAA AGATT ATG CACACAATTAAATCTTATTTTAGCC
1201D	GCCG CTGCAG TAAGT AAAAAAACAAACATATAA ACCACCAACCAAA AGATT ATG CACACAATTAAATCTTATTTTAGCC
1201E	GCCG CTGCAG TAAGT AAAAAAACAAACATATAA TTAATAAAAAAAA AGATT ATG CACACAATTAAATCTTATTTTAGCC
RTnucBF	TGGTTGCTTGCAGTAG
RTnucBR	AGAAGCGGAAGACCCAGATGT
RT16SF	AAATGTCCGGGCTAACCT
RT16SR	ACCGCTACACCAACGAATTCC
kontrnnuc	GGTTAAGCCATGCGGGTATC

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 LB (Lysogeny broth)

Zatehtali in raztopili smo 1 % (w/V) triptona, 1 % (w/V) NaCl in 0,5 % (w/V) kvasnega ekstrakta v destilirani vodi. Gojišče smo alikvotirali in avtoklavirali pri 121 °C za 15 min. Za pripravo trdnega gojišča, smo dodali še 1,5 % (w/V) agarja (Bertani, 1951).

3.1.3.2 M2

Uporabili smo postopek kot je opisan v članku (Hobson, 1969). Zatehtali smo 1 % (w/V) triptona, 0,25 % (w/V) kavasnega izvlečka, 0,2 % (w/V) glukoze, 0,2% (w/V) celobooze, 0,2 % (w/V) topnega škroba, 0,4 % (w/V) NaHCO_3 , 15 % (V/V) mineralne raztopine I [0,3 % (w/V) K_2HPO_4], 15 % (V/V) mineralne raztopine II [0,3 % (w/V) KH_2PO_4 , 0,6 % (w/V) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 % (w/V) NaCl , 0,065 % (w/V) $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,06 % (w/V) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], 30 % (V/V) vampnega soka, 0,001 % (w/V) resazurin in 40 % (V/V) destilirane vode. Raztopino smo prevreli in prepihovali z ogljikovim dioksidom do spremembe barve indikatorja, resazurina, kar je trajalo okvirno 10 min in nato dodali 0,1 % (w/V) L-cistein HCl. Za pripravo poltrdnega »sloppy« gojišča, smo dodali 0,75 % (w/V) agarja. Gojišče smo alikvotirali s pomočjo Hungatovih anaerobnih tehnik in avtoklavirali pri 121 °C za 15 min.

3.1.3.3 M330

Za pripravo M330 smo modificirali postopek opisan v DSMZ, Nemški zbirki mikroorganizmov in celičnih kultur (DSMZ, 2007). Zatehtali smo dikalijev fosfat, pepton, kvasni ekstrakt, topni škrob, dvojno količino glukoze, maltozo in celubiozo. Dodali mineralno raztopino, resazurin in destilirano vodo. Vodo smo dodali s prebitkom ene desetine volumna zaradi izhlapevanja. Raztopino smo prevreli in prepihovali z ogljikovim dioksidom do spremembe barve indikatorja, resazurina. Ohljeni tekočini smo nato ob stalnem prepihovanju z ogljikovim dioksidom dodali natrijev karbonat, cistein in hemin, v digestoriju pa še mešanico hlapnih maščobnih kislin. Gojišču smo izmerili pH, ga alikvotirali s pomočjo Hugatovih anaerobnih tehnik in avtoklavirali pri 121 °C za 15 min.

3.1.3.4 Hranilni agar

Uporabili smo hranilni agar v prahu (Biolife, ZDA). Pripravi smo ga po navodilih proizvajalca.

3.1.4 Kemikalije

Amersham biosciences:	ECL WB detection reagents
Applied biosystem:	Power SYBR Green m. mix PCR
New England Biolabs:	<i>Sau3AI</i>
Biolife:	Kvasni ekstrakt Nutrient broth Agar Hranilni agar Pepton
BIO Whittaker:	Sea Kem LE agarosa
CalBiochem:	D(+) celubioza
Fermentas :	DNA lestvica #SM0311 T4 ligaza #EL0019 DNA λ #SD0011 Taq polimeraza #EP0282 dNTP mix #R0249 revert AID #EP0449
Fermentas:	HF PCR MIX #K0192 FD <i>PstI</i> #FD0614 <i>EcoRI</i> #ER0271 Ribolock #EO0381 Alkalna fosfataza #EF0511
Kemika:	KH_2PO_4 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ D (+) glukoza
Life Technologies:	Trizol
Liofilchem:	Tripton
Merck:	Metanol 99,8 % NaCl Topni škrob

Merck:	NaCHO3 Tris Tris-HCl SDS NaCO3 MgCl2 Mleko v prahu K ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ X 6H ₂ O L-cistein
Microsynth	Oligonukleotidni začetniki
Novagen:	Sup. Signal HRP Substrat 69059-3
Quiagen:	gel extraction kit #28704
Roche :	ANTI-his6 protitelesa »High Pure PCR Product Purification Kit« (#11732668001) »High Pure Plasmid Isolation Kit« (#11754785001)
Sigma:	Absolutni etanol Glicin Fenol-kloroform P2069 Akrilamid/BIS-akrilamid A3794 voda brez nukleaz EDTA
Thermo Scientific:	10-250KDa proteinska lestvica

3.1.5 Pufri in raztopine

Pufer za agarozno gelsko elektroforezo

- TBE (Tris-borat-EDTA)

Sestavljen je iz 98 mM Tris-baze, 98 mM Borove kisline, 2 mM EDTA in preostanka dH₂O.

Pufri za prenos Western

- Katodni pufer za prenos Western

Sestavljen je iz 25 mM Tris baze, 40 mM glicina, 10 % (V/V) metanola in preostanka MQ.

Pufer ima pH 9,4.

- Anodni pufer za prenos Western I

Sestavljen je iz 0,3 M Tris baze, 10 % (V/V) metanola in preostanka MQ. Pufer ima pH 10,4.

- Anodni pufer za prenos Western II

Sestavljen je iz 25 mM Tris baze, 10 % (V/V) metanola in preostanka MQ. Pufer ima pH 10,4.

- TBST (za spiranje PVDF membrane)

Sestavljen je iz 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (V/V) Tween 20 in preostanka MQ. Pufer ima pH 7,5.

- TBST-bloker (za blokiranje membrane PVDF po SDS-page)

Sestavljen je iz TBST in 5 % (W/V) posnetega mleka v prahu.

Laemmlji pufri za SDS-page

- 6X nalagalni pufer

Sestavljen je iz 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 , 25 % glicerol a, 2 % SDS , 0,01 % Bromophenol Blue in 5 % β -Mercaptoetanol.

- delovni pufer za SDS-page

Sestavljen je iz 2,5 mM Tris-baze, 19,2 mM glicina, 0,01 % SDS in preostanka MQ. Pufer ima pH 8,3.

- APS

Je 10 % (W/V) amonijev persulfat raztopljen v MQ.

3.1.6 Naprave

Applied biosystem (ZDA): ViiA 7.0

Beckman Coulter (Inc.): ALLEGRA™ X-12R centrifuge (centrifuga)

Bellco (ZDA): Hungate epruvete

Biorad (Inc.): Mini protean 3 cell (naprava za WB)

MY CYCLER Thermal cycler (PCR naprava)

MINI SUB CELL GT (elektroforezna kad)

POWER PAC (Napajalnik)

GEL DOC 1000 (naprava za fotografiranje v UV spektru)

MOLECULAR ANALYST SOFTWARE version 1.5 (Programska oprema za delo z GEL DOC 1000)

Biosan (inc.): DNA in RNA FREE CHAMBER (laminarij)

Biospec prod.: Mini Beat Beatter

Chemas d.o.o (Slovenija): CH-100 BIOSAN (segrevalnik/ohlajevalnik za mikrocentrifugirke)

Deltalab: 100 mL Falkonke

Eppendorf (Nemčija): MINI SPIN PLUS (centrifuga)

Koncentrator (centrifuga)

Finnpipette (Inc.): Polavtomatske pipete

Gene-quantification (Nemčija): Relative Expression Software Tool (REST 2009©) (program za računanje izražanja pri RT-PCR)

Hettich zentrifugen (Nemčija): MIKRO 200R (centrifuga)

Icogamma (Španija): 2ml, 20ml BRIZGE

Kambič laboratorijska oprema (Slovenija): I-50 KOMORA 30°C KOMORA 37°C

AVTOKLAV A-21CA (avtoklav)

Merck Millipore (Inc.): Centrifugal filter units Ultracell-10k

Mettler Toledo (Slovenija): PN163 (tehntica)

P1210 (tehntica)

Multitron (ZDA): INFORST HT (temperirano stresalo)

MSH basic (Nemčija): YELOWLINE (magnetno mešalo)

Omega: (naprava in program za RT-PCR)

Pharma Biotech: Multiphor II Electrophoresis system 18-1103-43 ed. AF

Scientific industries (inc.): VORTEX-GENIE 2 (mešalo)

Scholzen Technik (Nemčija): LAMINARIJ

Syngene (UK): Genetools (program za kvantifikacijo lis na gelu)

GeneSnap (program za slikanje)

ChemiGenius² (naprava za slikanje)

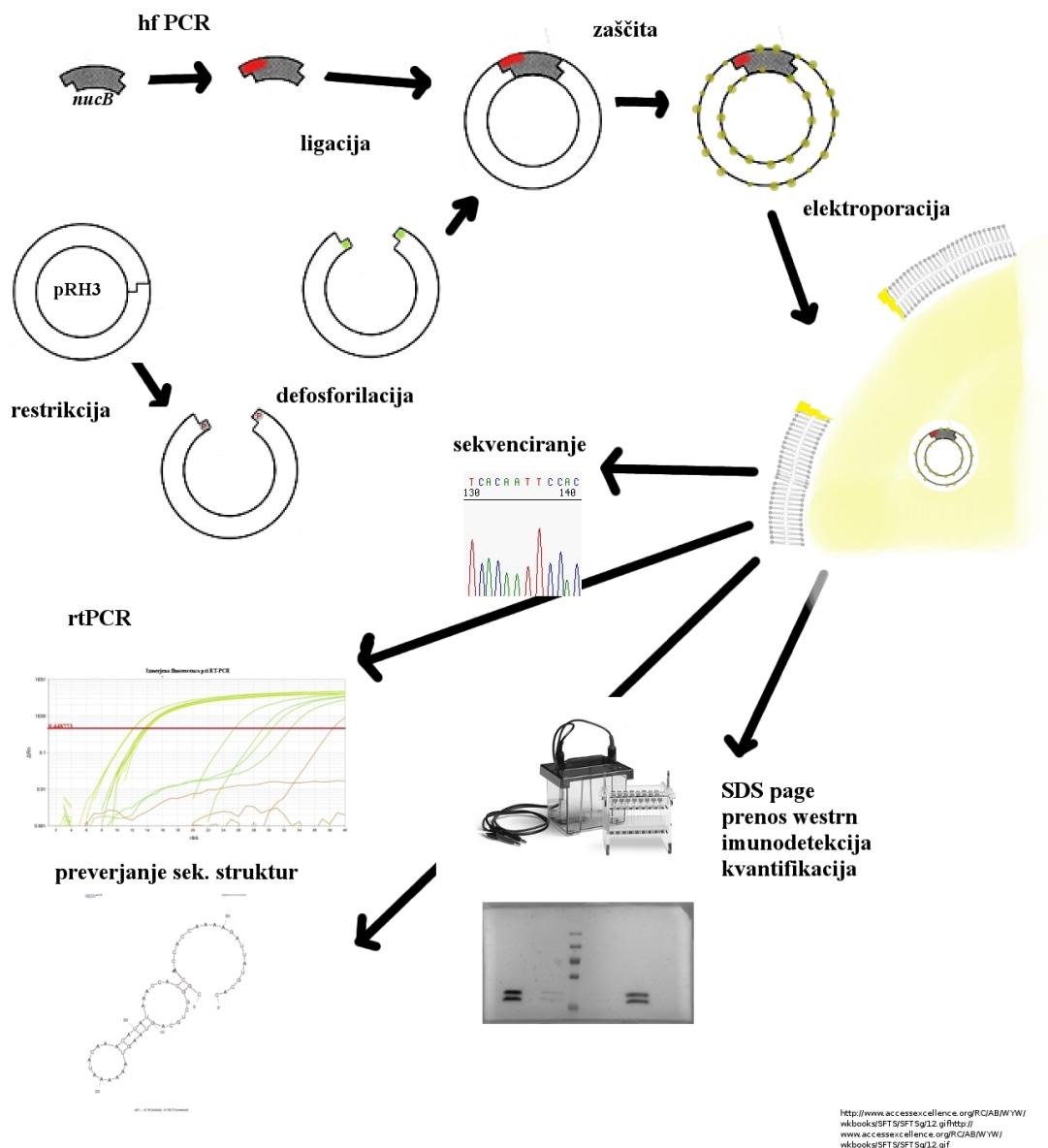
Tik (Slovenija): INJEKCIJSKE IGLE

Tehnica Železniki (Slovenija) RVI-403 (stresalnik)

3.2 METODE

3.2.1 Zastavljeni eksperiment

Proučevali smo vpliv nukleotidnega zaporedja neprevedenega regije pred start kodonom na izražanje gena *nucB* nastalega med PCR. Željene konstrukte poročevalnega gena *nucB* smo dobili s PCR kjer smo uporabili na 5' koncu podaljšane smiselne in protismiselne oligonukleotidne začetnike, ki so prikazani v preglednici 1 in opisani v točki 3.1.2. Dobljeni fragment DNA smo nato vstavili v plazmid in preverili njegovo orientacijo. Nato smo konstrukt zaščitili pred restriktijskim sistemom tipa II z metilazno aktivnostjo celičnega lizata *P. bryantii* TC1-1 (Accetto in sod., 2005) in ga elektroporirali v celice. Proučevani gen smo izrazili s pomočjo gojišča M330 z dodanim tetraciklinom. Produkt gena je zunajcelična nukleaza, zato smo razlike v količini proizvedene nukleaze med posameznimi konstrukti lahko ocenili z razliko v nukleazni aktivnosti posameznih supernatantov ozira z relativno količino imunodetektiranega proteina. Razlike v količini proteina lahko nastanejo tudi zaradi ponovne iniciacije translacije iz višje ležečega gena, različne stopnje transkripcije, tvorbe sekundarnih struktur v območju 20 nukleotidov pred start kodonom in mutacij v proučevani regiji. To smo nadzorovali. Stop kodon na začetku vstavljenega zaporedja je ustavil ponovno iniciacijo. Količino mRNA smo preverili z dvostopenjskim PCR v realnem času z obratnim prepisovanjem. Možne sekundarne strukture smo preučili s pomočjo programa mFOLD. Neoporečnost proučevane regije smo preverili s sekvenciranjem (Accetto in Avguštin, 2007).



Slika 3: Shema dela

3.2.2 Priprava kompetentnih celic *E. coli* in transformacija

Kompetenco celic smo inducirali kemično. Pelet seva *E. coli* TOP10, vzgojenega v gojišču LB in shranjenega pri -70 °C, smo v zgodnji logaritemski fazi ($OD_{654}=0,3$) dvakrat sprali z ledeno hladnim 0,1 M kalcijevim kloridom. Celice smo transformirali s temperaturnim šokom. Alikvotu kompetentnih celic smo dodali 0,25 µg plazmidne DNA. Sledile so tri inkubacije. Prva je bila na ledu za od 20 do 30 min. Druga je 90 s pri 42 °C. Tretja je bila zopet na ledu od 2 do 3 min. Celotno vsebino smo nacepili v 400 µL gojišča LB in ob konstantnem mešanju pri 200 obratih na minuto inkubirali pri 37 °C od 45 do 60 min. Nato smo želene redčitve in kontrolo nacepili na plošče LB z amplicilinom in inkubirali pri 37 °C čez noč. Naslednji dan smo prešteli kolonije, torej CFU, potomke celice, ki so sprejele plazmidno DNA s selekcijskim markerjem. Frekvenco transformacije smo podali kot število transformant, preračunano na 1 µg uporabljene DNA in na 1 mL gojišča.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

V posebni komori smo z orodjem in materialom, namenjenim samo za PCR reakcije, pripravili izhodiščno zmes. Postavili smo jo na hladilno ploščo, dodali encim in alikvotirali. Izven komore smo dodali matrico DNA. Reakcijo smo izvedli v MY CYCLER Thermal cycler (Biorad, ZDA). Sestavine posamezne reakcije so prikazane v preglednici 2. Uporabljeni PCR program smo prilagodili talilni temperaturi začetnih oligonukleotidov in dolžini pomnožka. Primer je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 2: Sestavine, splošne koncentracije oziroma količine za PCR in le-te preračunane za tipično reakcijo z volumnom 20 µL.

Sestavina	Količina ali koncentracija	Primer za 20 µL reakcijo
DNA	50-70 ng	1 µL
Oligonukleotidna začetka	0,2 uM	2 µL
dNTPji	0,2 uM	2 µL
MgCl ₂	2 mM	3,2 µL
polimeraza	1 enc enota/1uL reakcije	0,15 µL
10X pufer	1/10 reakcije	2 µL µL
dH ₂ O	Manjkajoči volumen	9,65 µL

Preglednica 3: Uporabljene temperature, čas in ponovitve posameznih ciklov.

Začetna denaturacija	1X	94 °C	1 min
Denaturacija		94 °C	40 s
Naleganje oligonukleotidov	30X	54 °C	40 s
Elongacija		72 °C	90 s
Končna elongacija	1X	70 °C	10 min
Shranjevalna temperatura	1X	4 °C	

3.2.4 Izolacija plazmidne DNA

Plazmid smo izolirali s kompletom »High Pure Plasmid Isolation Kit« (#11754785001). Sledili smo navodilom proizvajalca.

3.2.5 Cepitev DNA z restriktijsko endonukleazo

Pripravili smo 10 µL reakcije. Vrsto pufra smo prilagodili encimu. Inkubirali smo 1 h pri 37 °C. V reakcijsko mešanico smo dodali 1 µL 10X pufra, 0,5 µL encima, 1 µL vzorca in 7,5 µL prečiščene vode brez nukleaz.

3.2.6 Agarozna gelska elektroforeza

Glede na velikost naših fragmentov, ki je segala od 200 bp do 10 kbp, smo kot marker uporabili 1kb DNA lestvico proizvajalca Fermentas (Inc.) ter 0,7 % (w/V) agarozni gel v 0,5X pufru TBE. Postopek smo izvajali 1 h pri konstantni napetosti 100 V. Razporejeno DNA v gelu smo nato obarvali z nekaj minutno kopeljo v raztopini etidijevega bromida in nato še razbarvali gel v destilirani vodi. Fluorescirajoči gel smo nato fotografirali z napravo GEL DOC 1000 in programom MOLECULAR ANALYST SOFTWARE version 1.5 (Biorad, ZDA). Pri fotografiranju smo pazili, da je bil signal v linearjem območju zaznavanja.

3.2.7 Defosforilacija oz. priprava vektorja za ligacijo

Da bi ob ligaciji preprečili ponovno zaprtje plazmidne DNA brez vključkov, smo po cepitvi z restriktijsko endonukleazo z alkalno fosfatazo (AF) odstranili fosforno skupino iz obeh 5' koncov DNA. Pri ligaciji eno fosforno skupino doprinese vključek, medtem ko v drugi verigi DNA ostane zareza do prvega podvajanja. Količino AF in restriktijskega pufra smo preračunali glede na količino plazmidne DNA v vzorcu. Ugotovili smo jo z metodo 3.2.7. Tako smo dobili masno koncentracijo DNA našega vzorca, jo primerjali s statističnimi vrednostmi podobno dolgih verig in s tem okvirno ugotovili molarno koncentracijo DNA, ki smo jo uporabili za izračun potrebnih encimskih enot. Upoštevali smo tudi, da mora alkalna fosfataza odstraniti fosforno skupino na obeh 5' koncih dvostranske DNA, torej jo potrebujemo temu primerno več. Reakcijska mešanica, sestavljena podobno kot pri metodi 3.2.1., je vsebovala alkalno fosfatazo, restriktijski encim, pufer za delovanje obeh encimov in raztopino plazmidnega vektorja. Inkubirali smo jo pri 37 °C za 1,5 h.

3.2.8 Ligacija

Reakcijske mešanice smo sestavili tako kot kaže preglednica 4. Reakcija je potekala 1,5 h pri 22 °C. Encim T4 DNA ligazo smo po koncu reakcije deaktivirali z inkubacijo za 10 min pri 65 °C. Ligaciji je sledila transformacija. S kontrolo vektorja smo ocenili, kako pogosto se plazmid sam zaokroži. S kontrolo defosforilacije smo opazovali padec števila kolonij med to in prejšnjo reakcijo in s tem ocenili učinkovitost defosforilacije. Zadnja reakcija nam je dala iskani produkt.

Preglednica 4: Reakcijske mešanice za ligacijo

Vse vrednosti so v µL	KONTROLA VEKTORJA	KONTROLA DEFOSFORILACIJE	LIGACIJSKA REAKCIJA
PUFER	1	1	1
VEKTOR	1	1	1
VKLJUČEK	0	0	4
LIGAZA	1	1	1
VODA	7	7	3

3.2.9 Čiščenje raztopin DNA

Uporabili smo High pure PCR produkt komplet firme Roche Diagnostics GmbH Z (Švica). Z njim smo odstranili encime, nukleotide, začetne oligonukleotide in druge sestavine pufrov iz reakcijskih mešanic. Sledili smo navodilom proizvajalca.

3.2.10 Preverjanje usmerjenosti vključka

Pri vstavljanju gena *nucB* v plazmidni vektor pRH3 smo uporabili le eno restrikcijsko mesto. Zato nismo imeli vpliva na orientacijo vključka v našem plazmidu. Rekombinantne plazmide z zaželeno usmerjenimi vključki smo zato ugotovili z dvojno restrikcijo. Rekombinantno plazmidno DNA smo cepili z encimoma *Eco*RI in *Hind*III in posledično

ugotavljal razlike velikosti fragmentov glede na usmerjenost. Pri najočitnejši razliki smo v pravilni orientaciji dobili 400 bp dolg fragment, medtem ko je bil v nepravilni orientaciji primerljiv fragment dolg 500 bp. Orientacija fragmenta je pomembna, ker bi pri nepravilni usmeritvi bile kodogena in nekodogena veriga zamenjani in tako ne bi dobili smiselnega transkripcijskega produkta. Dokončno smo orientacijo preverili s sekvenciranjem.

3.2.11 Kvantifikacija vzorca na fotografiji agaroznega gela ali membrane

Kvantifikacijo vzorca smo opravili s pomočjo programa Genetools (Syngene, UK). Na nespremenjeni in pravilno osvetljeni fotografiji gela smo lise ovrednotili relativno ali absolutno. Program primerja intenzitete posameznih lis, ki sovpadajo s količino vzorca na tem mestu. Sami smo določili, kje lise so in ali je znana količina standarda. Popravek ozadja smo nastavili na samodejno.

3.2.12 Priprava celičnega lizata

Celice smo v 10 mL gojišča M2 namnožili do logaritemske faze pri OD_{654 nm} med 1,0 do 1,4. Prestavili smo jih v ledeno kopel za 10 min in jih od supernatanta ločili s centrifugiranjem pri 5000 g za 10 min ter sprali s hladno raztopino I (20 mM TRIS-Cl in 10 mM 2-merkaptoetanol). Pelet smo resuspendirali v 500 µL raztopine I in prenesli v mikrocentrifugirke »beadbeater«, ki so vsebovale 0,3 g cirkonijevih kroglic velikosti 0,5 mm ter enako količino 0,1 mm velikih kroglic. Mikrocentrifugirke smo nato petkrat za 20 s stresali pri 5000 udarcih na minuto v napravi Mini-Beadbeater-1 firme BioSpec. Med ponovitvami smo epico za 2 min inkubirali na ledu. Nadaljevali smo s centrifugiranjem pri 12000 g za 15 min pri 4 °C. Dodali smo streptomycin do 2 % koncentracije in inkubirali na ledu za 30 min ter nato centrifugrali pri 18000 g za 25 min pri 4 °C. Dobljeni supernant, naš celični lizat, smo previdno, brez peleta, odpipetirali in uporabili pri zaščiti DNA.

3.2.13 *In vitro* zaščita DNA proti restriktijskem encimu *PbrTI* iz *P. bryantii* TC1-1

Reakcijo smo sestavili iz 150 µL celičnega lizata, 100 µL DNA, kar je bilo v našem primeru okvirno 2 ug, dodali TRIS pH 7,5 do 50 mM, EDTA do 20 mM in S-adenozil metionin do 0,3 mM. Inkubacija je potekala 10 h pri 37 °C. Nato smo odstranili vse proteine iz celičnega lizata z ekstrakcijo z mešanico fenola in kloroformra. Centrifugirali 10 min pri 8000 g. Izmerjeno količino zgornje, vodne faze smo nato očistili še s kompletom Qiagen-gel extraction kit, pri katerem smo sledili navodilom proizvajalca. Zaščito smo preverili z restriktijskim encimom *Sau3AI* (Accetto in sod., 2005).

3.2.14 Elektroporacija *P. bryantii* TC1-1

Celice smo pripravili z inokulacijo dvanajstih 10 mL velikih gojišč M2, gojenih pri 37 °C do OD₆₅₄ 0,8. S tremi ponovitvami spiranja s hladnim, prevretim in s CO₂ prepihanim 10 % glicerolom in centrifugiranja za 7-9 min pri 10000 g pri 4 °C smo skoncentrirali celice na 900 µL oziroma 6 alikvotov. Te smo shranili pri -70 °C. Samo delo je potekalo anaerobno z uporabo Hungatovih tehnik in v ledeni kopeli. Tako pripravljene celice smo skupaj z zaščiteno DNA uporabili pri elektroporaciji. Najprej smo izmerili upor vzorca celic s pomočjo električnega napajalnika za gelsko elektroforezo. Kiveto z reakcijsko mešanico spranih celic in plazmidne DNA smo izpostavili konstantni znani napetosti, iz naprave odčitali jakost električnega toka in s pomočjo Ohmovega zakona izračunali upornost. S tem smo se prepričali, da pri elektroporaciji ne bo stekel prevelik električni tok, ki bi uničil celice. Vzorce smo nato elektroporirali z 2,51 kV sunkom, dolgim 3,7 ms. Z reakcijsko mešanico smo nato inokulirali gojišča M2 in z naraščanjem optične gostote spremljali rast pri 37 °C. Ko se je pokazalo podvojevanje, smo za selekcijo transformant dodali tetraciklin in pripravili 10X redčeno paralelko.

3.2.15 Preverjanje nukleazne aktivnosti supernantanta kulture *P. bryantii* TC1-1

Supernatant smo pridobili s centrifugiranjem prekonočne kulture, gojene v gojišču M330 pri 37 °C. Nukleazno aktivnost smo preverili z dodajanjem 17 µL supernatanta, 1 µL 100 mM MgCl₂ kot kofaktor in 0,5 ug DNA bakteriofaga λ kot substrat za nukleaze.

Reakcijo smo inkubirali za 10 min pri 37 °C. Proteine v supernatantu smo nato denaturirali s 6 µL mešanice fenola in kloroforma in odstranili s centrifugiranjem za 8 min na 12000 g. Z nastalo zgornjo vodno fazo smo izvedli agarozno gelsko elektroforezo (metoda 3.2.6), ki nam je pokazala, kako močno se je spremenil substrat.

3.2.16 Priprava gela za poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE)

Uporabili smo gel debeline 1,5 mm, vlitega v kalup Mini-protean 3 cell firme BIORAD. Vsa plastika in steklovina v stiku z gelom je bila predhodno očiščena z MQ in 100 % etanolom. Ločevalni gel smo pripravili v nuči iz vode MQ, TrisCl pH 8,8, SDS in akrilamida. Mešanici smo po 10 min odzračevanju z vakuumsko črpalko dodali še APS in TEMED. Celoten volumen smo odpipetirali v sendvič in ga prelili z okvirno 150 µL MQ. Počakali smo 60 min, da je polimeriziral. V tem času smo po istem postopku pripravili nabijalni gel. Razlike v kemikalijah, količini in koncentracijah so opisane v preglednici 5. Med odzračevanjem nabijalnega gela smo ločevalnega trikrat sprali z MQ in vodo nato odstranili s filter papirjem. V nabijalni gel smo nato vstavili glavnik. Polimerizacija je ponovno potekala 60 min. Do uporabe smo gel shranili v hladilniku.

Preglednica 5: Sestavine ločevalnega in nabijalnega gela za SDS-page

	Ločevalni gel	Nabijalni gel
Kemikalije	Volumen	
MQ	4,015 mL	6,01 mL
0,5 M TrisCl pH 6,8		2,5 mL
1,5 M TrisCL pH 8,8	2,5 mL	
10 % SDS	0,1 mL	0,1 mL
30 % akrilamid	3,33 mL	1,33 mL
10 % APS	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL

3.2.17 Priprava vzorca za SDS-Page

Supernatant smo pridobili tako kot pri točki 3.2.12. S pomočjo koncentratorjev Centrifugal filter units Ultracell-10k (Merck Millipore, Inc.) smo ga na centrifugi ALLEGRA™ X-12R centrifuge (BECKMAN COULTER, Inc.) pri 3200g zgostili iz 9 mL do okvirno 200 μ L, kar je trajalo okvirno 15 min. Razliko v volumnih zgoščenih supernatantov smo zabeležili in upoštevali pri pripravi vzorca za nalaganje na gel. Supernatant, dodan v vzorce, smo redčili z MQ. Za vzorec smo uporabili 50 μ L supernatanta in 10 μ L 6X nalagalnega pufra. To mešanico smo inkubirali za 4 min na 100 °C in jo nato centrifugirali 5 min pri 12000 g.

3.2.18 SDS-Page

Uporabili smo Mini protean 3 cell (Biorad, Inc.). Ravnali smo po navodilu proizvajalca. Sendvič z našim gelom smo z manjšo stekleno ploščo znotraj vpeli v primež in vstavili v kad. Napolnili smo notranji rezervoar z elektroforetskim pufrom malo čez višino gela. Preverili smo, da rezervoar ne pušča. Nato smo z istim pufrom napolnili še zunanjou kad. Pufer smo nalili čez spodnji rob gela. Na gel smo nanašali 50 μ L vzorca. V prazne žepke smo nanesli 30 μ L 1x nanašalnega pufra. Uporabili smo tudi 3 μ L velikostnega markerja. Elektroforezo smo pognali pri konstantnih 150-170 V za okvirno 90 min oziroma dokler ni črta bromfenol modrega prišla do konca gela.

3.2.19 Prenos Western

Proteine smo iz gela prenesli na membrano PVDF firme Bio-Rad iz ZDA. Uporabili smo Multiphor II NovaBlot napravo firme Pharmacia Biotech iz Švedske. Razdrli smo SDS-PAGE napravo in gelček brez nabijalnega dela izmerili. V tej velikosti smo odrezali kos membrane in 6 kosov filter papirja. Le-tega smo namočili v ustrezne pufre, katerih sestava je opisana v 3.1.5. Na očiščeno in z destilirano vodo nasičeno ogljikovo anodo smo, brez ujetih mehurčkov zraka, enega nad drugim, položili dva filter papirja namočena v anodni pufer 1, en filter papir namočen v anodni pufer 2, membrano namočeno v anodni pufer 2, gel in tri filter papirje namočene v katodni pufer. Na ta sendvič smo namestili katodo. S prej izmerjeno površino smo izračunali potreben tok. Ravnali smo se po 1,5 mA na

kvadratni centimeter. Največjo napetost smo omejili na 300 V. Prenos je trajal 90 min. Membrano smo nato v raztopini za blok inkubirali pri 4 °C preko noči.

3.2.20 Imunodetekcija

Proteine na membrani smo zaznali z uporabo monoklonskih mišjih protiteles z anti-his (Roche, Švica) in sekundarnih HRP protiteles koze na mišja protiteesa. Spirali smo s pufrom TBST. Oddano svetlobo smo zajeli z napravo Chemigenius² bio imagining system in programom Genesnap (Syngene, UK). Z Genetools (Syngene, UK) smo opravili kvantifikacijo. Pri programskeh nastavitevah smo pazili na ostrino, zaslonko, možnost brez filtrov in brez zunanje dodatne luči. Čas ekspozicije smo nastavili na 10 min, fotografije so bile pa zajete tudi vsaki dve vmesni minut. To fotografijo smo tudi združili s posnetkom z zunanjim virom svetlobe. Tako smo dobili združeno fotografijo, na kateri so bili vidne lise in označevalec velikosti.

3.2.21 Izolacija RNA

Uporabili smo TRIzol reagent (Invitrogen, ZDA) in sledili navodilom proizvajalca (Trizol Reagent, 2012). Kot vzorec smo uporabili sev *P. bryantii* TC1-1, inokuliran v gojišče M330 s tetraciklinom in zraščeno do OD_{654nm} 0,3. Vzorec smo speletirali s centrifugiranjem za 20 min pri 3000 obratih in 20 °C, odstranili smo supernatant in peletu dodali 2 mL Trizola. Močno smo premešali in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Za ločitev faz smo dodali 0,2 mL kloroforma na 1 mL uporabljenega Trizola. Suspenzijo smo ročno mešali 15 s, inkubirali 3 min. Centrifugirali za 15 min pri 12000 g in 4 °C. RNA smo iz dobljene zgornje vodne faze precipitirali z dodatkom 0,5 mL Izopropanola na 1 mL uporabljenega Trizola. Po 10-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo centrifugirali za 10 min pri 12000 g in 4 °C. Nastali RNA pelet smo sprali s 75-odstotnim etanolom. Centrifugirali za 5 min pri 7500g in 4 °C. Pelet smo raztopili v 30 µL sterilne vode brez RNA (Fermentas, Litva). Vzorec smo shranili pri -70 °C.

3.2.22 Ugotavljanje čistosti in koncentracije RNA

Po izolaciji RNA smo del vzorca 50X redčili in mu s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 320 nm, 280 nm in 260 nm. Čistost smo izračunali s pomočjo enačbe 1. Koncentracijo smo izračunali iz Beer-Lambertovega zakona, enačba 2. Upoštevali smo, da je povprečen ekstincijski koeficient (ϵ) za enoverižno RNA 0.025 $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in da je dolžina kivete (l) 1 cm.

$$\frac{A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}}}{A_{280\text{nm}} - A_{320\text{nm}}} \dots(1)$$

Enačba za oceno čistosti vzorca z upoštevanjem ozadja

$$c_{[\mu\text{g}/\text{mL}]} = \frac{A_{260\text{nm}}}{(\epsilon l)} \dots(2)$$

Enačba za izračun koncentracije RNA v vzorcu

3.2.23 Čiščenje vzorca RNA z DNAAzo

Postopek smo opravili v laminariju. Delovne površine smo očistili z alkoholom in sterilizirali z UV svetlobo. Koncentracija vzorca v reakciji je bila 0,1 g/L. Potrebno količino smo izračunali iz prej dobljenih koncentracij RNA. Naše 30 μL velike reakcije smo sestavili še iz encima DNAAze (Fermentas, Litva), encimu primernega pufra in sterilne vode brez RNA (Fermentas, Litva). Po inkubaciji za 1 h na 37 °C smo inhibirali encim s 3 μL 25 mM EDTA in dodatno z inkubacijo za 10 min na 65 °C.

3.2.24 Obratno prepisovanje

Postopek smo opravili v laminariju. Delovne površine smo očistili z alkoholom in sterilizirali z UV svetlobo. Vzorec smo hladili na ledu. Naredili smo tri reakcije. Eno za 16S rRNA, drugo za gen *nucB* in neaktivno kontrolo brez encima. Reakcijo smo sestavili iz 10 µL z DNAzo očiščenega vzorca, ki smo mu dodali 1 µL reverznega začetnega oligonukleotida. Inkubirali smo za 5 min pri 65 °C, ohladili na sobno temperaturo in dodali 8 µL osnovne raztopine, katere sestava je prikazana v preglednici 6 z 1 µL reverzne transkriptaze, Revert AID (Fermentas ZDA). Reakcijo smo najprej inkubirali za 45 min pri 42 °C in nato za prekinitev reakcije 5 min pri 85 stopinj Celzija. Nastalo v vzorcu pripravljeno DNA smo pomnožili s PCR in preverili na gelski elektroforezi.

Preglednica 6: Sestavine osnovne zmesi za obratno prepisovanje

Kemikalije	Količina za 1 reakcijo [µL]
5Xpufer REVERT AID	4
10mM dNTP	1
RIBOLOCK (RNAsni inhibitor)	0,5
H2O	2,5

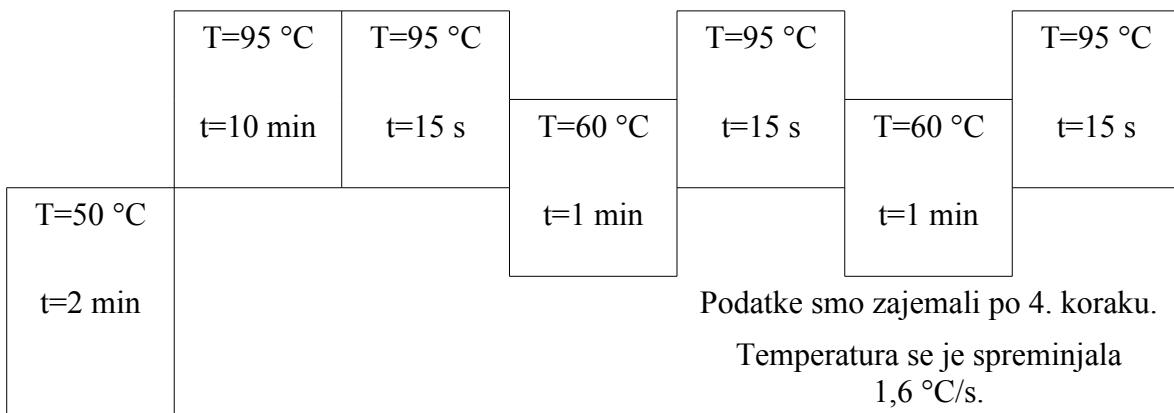
3.2.25 Izvedba PCR v realnem času

Z vzorci, dobljenimi pri obratnem prepisovanju, smo izvedli PCR v realnem času za relativno kvantifikacijo genske ekspresije. Uporabili smo celoten par začetnih oligonukleotidov in ne le protismiselne kot pri prepisovanju RNA v DNA. Za zaznavanje smo uporabili fluorescenčno barvilo SYBR Green I (Applied biosystem, ZDA). Rezultate smo normalizirali z endogeno kontrolo, za katero nam je služila 16S rRNA. Umeritveno krivuljo smo naredili iz enega izmed 4 vzorcev. Za tarčo *nucB* smo uporabili redčitve 1X, 2X, 10X, 20X, 100X, medtem ko smo pri tarči 16S cDNA uporabili redčitve 1000X, 5000X, 10000X in 50000X. Podobno kot pri navadnem PCR smo osnovno raztopino,

začetne oligonukleotide in H₂O pripravili, odmerili in alikvotirali v za to namenjeni komori, medtem ko smo 1 µL DNA dodali na delovnem pultu in s tem dopolnili 20 µL reakcijo. Kot osnovno zmes smo uporabili vnaprej pripravljeno raztopino SYBR Green mix (Applied biosystem, ZDA). Reakcije smo na optično ploščo nanašali v tripletih. Poleg vzorcev smo nanesli tudi NTC, ki niso vsebovali DNA matrice in vzorce, ki so kot matrico vsebovali negativne kontrole iz reakcije obratnega prepisovanja. Program pomnoževanja je prikazan v preglednici 7. Reakcijo smo izvedli v napravi ViiA 7.0 (Applied biosystem, ZDA). Rezultate smo ovrednotili s pomočjo programa Relative Expression Software Tool (REST 2009©) (Gene-quantification, Nemčija) ali s priloženim programom ViiA 7.0. Delali smo s tripleti in poskus ponovili trikrat.

Preglednica 7: Shema PCR v realnem času

1. korak	2. korak	3. korak	4. korak	5. korak	6. korak	7. korak
1X	1X		40X		1X	1X



3.2.26 Sekvenciranje

Sekvenciranje je opravilo Microsynth (Avstrija). Odpipetirali smo 15 µL vzorca plazmidne DNA v posebno, že označeno mikrocentrifugirko. Pripravili 50 µL 10 µM začetnega oligonukleotida za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja. Pošiljki smo priložili še dopis s

podatki o vzorcu in pošiljatelju. Vrnjene sekvene smo preverili, ročno popravili kromatograme in jih nato poravnali s programom ClustalX2 (EMBL-EBI, UK).

3.2.27 Računanje relativne količine mRNA poročevalnega proteina *NucB* v posameznih sevih

Poskuse smo opravili v tripletih. Metodo rtPCR smo izvedli v treh različnih dnevih, torej devet rezultatov za vsako tarčo. Imeli smo dve tarči, 16S cDNA in *nucB* cDNA. Pražne cikle (CP) smo obdelali s programoma ViiA 7.0 in z REST. Zaradi lažje pridobljene literature o izračunih izražanja in oceni eksperimentalnih napak smo se nato odločili za slednjega (Pfaffl in sod., 2002; Avery, 2013; Pfaffl, 2004). Program REST temelji na enačbi Michael W. Pfaffl-a, enačba 3.

$$\text{relativna ekspresija} = \frac{E_{\text{tarča}}^{(CP_{\text{kontrola}} - CP_{\text{vzorec}})}}{E_{\text{referenca}}^{(CP_{\text{kontrola}} - CP_{\text{vzorec}})}} \quad \dots(3)$$

Enačba relativnega izražanja

Problemom pri statistični obdelavi, kot so majhni vzorec ($n=9$), nenormalni razporeditvi rezultatov (Avery, 2013) in računanje ocene napake eksponentnim funkcijam s spremenljivkami v osnovi in potenci, se program izogne z uporabo bootstrap metod in Taylorjeve vrste. Metoda Bootstrap deluje tako, da iz CP naredi štiri skupine (tarča-kontrola, tarča-vzorec, referenca-kontrola, referenca-vzorec), ki so spremenljivke v enačbi, s katero računa relativno izražanje. Za izračun uporabi naključno izbrano vrednost iz vsake posamezne skupine in to ponovi vsaj 2000-krat. Iz tako dobljene populacije relativnih izražanj oceni še 95 % interval zaupanja. Odstrani 2,5 % najmanjših in največjih vrednosti. Povrhu nam s Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test©, zamenjavo podatkov med in ne znotraj skupinami in posledičnim izračunom izražanja ovrednoti H_0 domnevo, ki pove ali sta kontrola in vzorec statistično različna. Program primerja dejanske in rezultate pridobljene z »zamenjanem«. Presteje vse »zamenjane«, ki preveč odstopajo, in sklepa, da če jih je veliko, potem je dejanski rezultat nastal po naključju in ni prišlo do statistično signifikantne razlike pri izražanju.

Ker bi naj prihajalo do razlik pri rezultatih pridobljenih v različnih dneh (Marino in sod., 2003), se nismo odločili, da bi nam programa sama ovrednotila vseh 9 rezultatov za posamezni sev naenkrat. Pri poskusnem izračunu na ta način je prišla tudi ocena napake zelo visoka, kot je razvidno v prilogi D. Zato smo prvo izračunali relativno količino mRNA za posamezen dan in šele nato te tri rezultate združili v končnega. Vse pridobljene CP za posamezen dan, za obe tarči, za posamezen sev smo vnesli v program. Tako smo dobili tri sete podatkov, ki predstavljajo razmerje, torej bi se naj razlike med poskusi v različnih dneh za isti sev, za iste tarče izničile. Ocnam relativnega izražanja smo izračunali aritmetično sredino. Standarni odklon (SD) smo najprej izračunali za posamezen dan iz območja standardne napake (SE) z enačbo 4, kjer smo za število vzorcev (n) vzeli triplet, torej n=3. Združili smo jih s teorijo o združevanju napak v internetnemu dokumentu (Hogan, 2006) in uporabili smo enačbo 5.

$$SD_{skupni} = \sqrt{SD_1^2 + SD_2^2 + SD_3^2}$$

Enačba za združevanje standardnih deviacij ... (4)

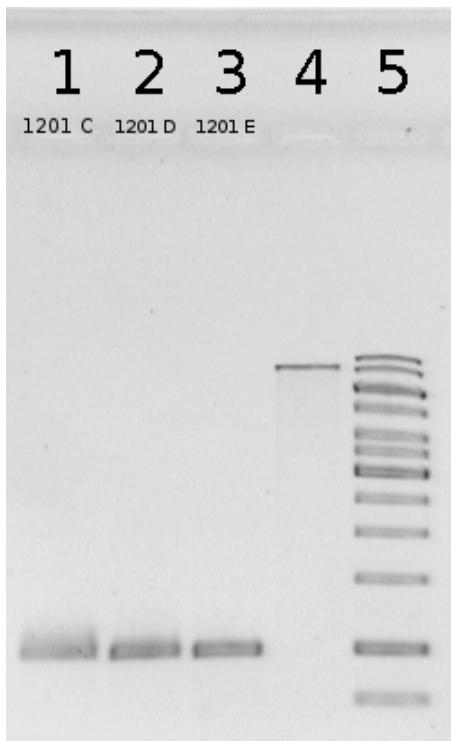
$$SD = \frac{(SE_{max} - SE_{min})}{2} \sqrt{n}$$

Enačba za pridobitev standarde deviacije ... (5)

4 REZULTATI

4.1 KLONIRANJE GENA *nucB*

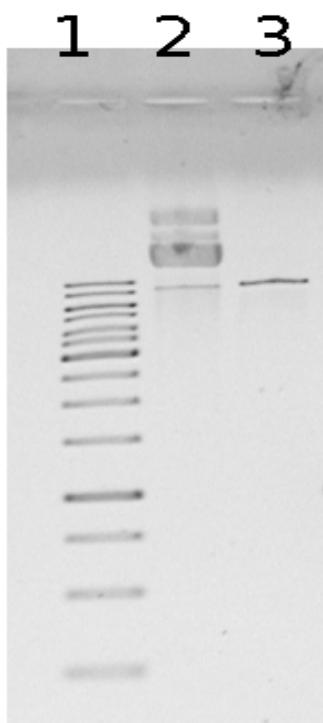
Gelska elektroforeza plazmidne DNA s kloniranim genom *nucB* in cepljeno s *PstI* je pokazala ustrezeno velikost fragmentov. Gelska elektroforeza je pokazala dve različno veliki lisi. Lisa velikosti okvirno 9 kb predstavlja linearizirano polazmidno DNA pRH3, medtem ko lisa velika okvirno 1 kb predstavlja gen *nucB*. Primer je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Gelska elektroforeza očiščene DNA gena *nucB* s spremenjenimi 5' konci neprevedene regije nastale s hfPCR

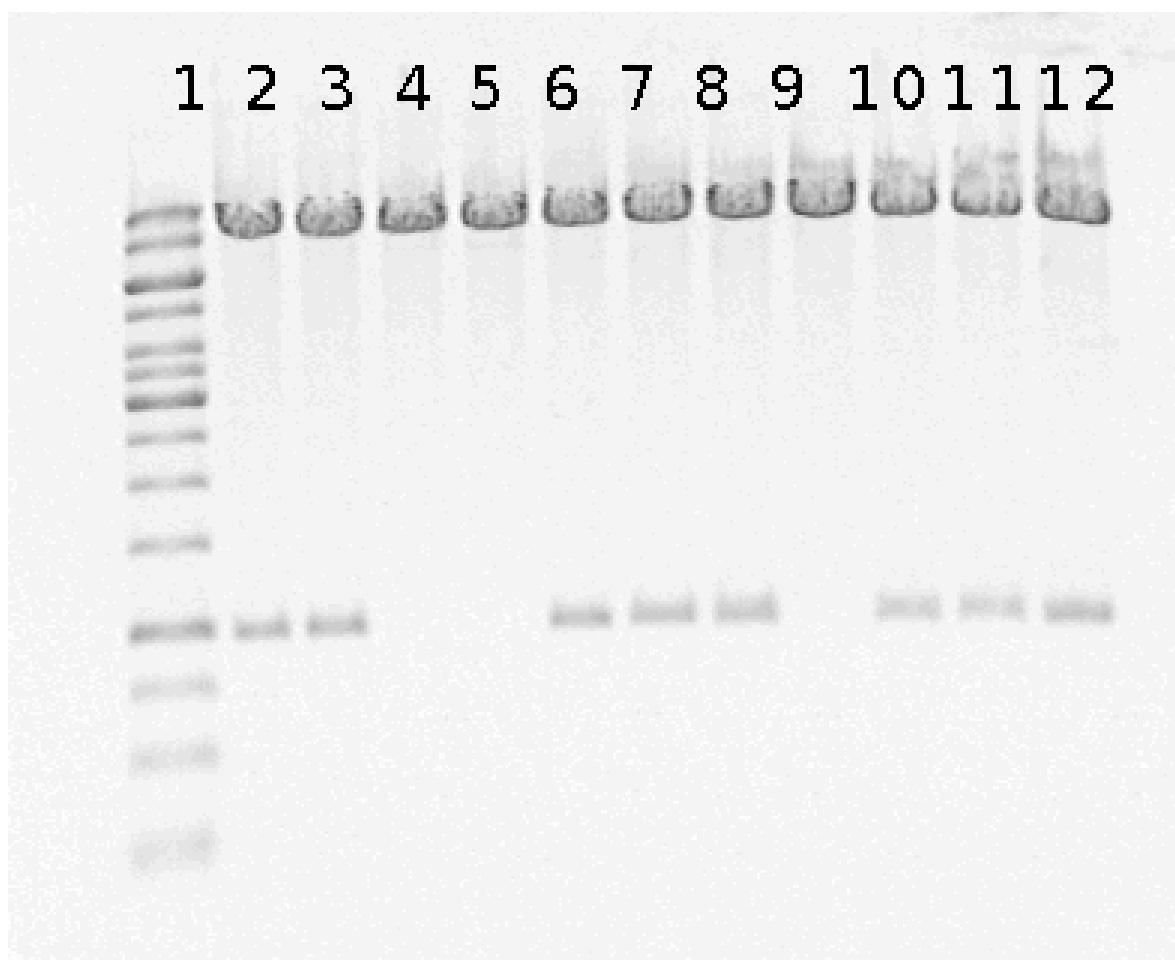
V stolpcih 1, 2 in 3 so po vrsti vzorci 1201 C, 1201 D, 1201 E. Sovpadajo s predvideno velikostjo 1 kb. V stolpcu 4 je s *PstI* lineariziran vektor pRH3, ki sovpada s predvideno velikostjo 9 kb. Stolpec 5 je velikostna lestvica.

Gelska elektroforeza plazmidne DNA pRH3 izolirane iz *E. coli* brez vključkov je prikazana na sliki 5 v stolpcu 2. Razvidni sta krožna in linearizirana oblika plazmidne DNA. V stolpcu 3 je plazmidna DNA pRH3 cepljena z restriktijskim encimom fd*PstI*, kar se na na gelu pozna kot uniformna in ostra lisa velikosti 9 kb.



Slika 5: Gelska elektroforeza prenosnega vektorja pRH3 izoliranega iz *E.coli* brez vključkov
Stolpec 1 je velikostna lestvica.
Stolpec 2 prikazuje vektor pRH3.
Stolpec 3 prikazuje vektor pRH3 cepljen z restriktazo fdPstI.

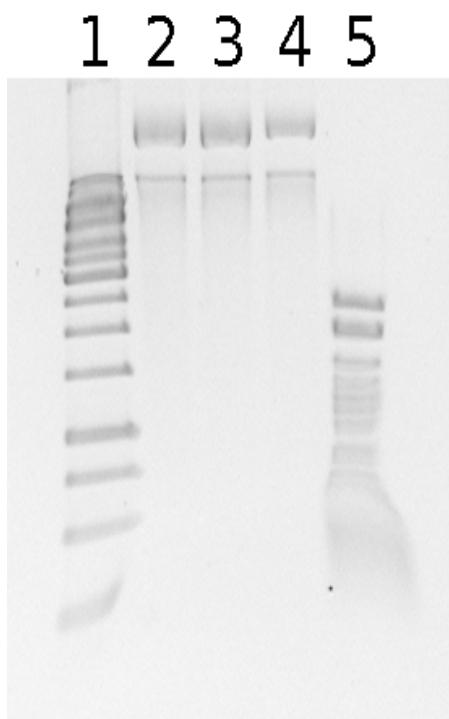
Transformacijo celic *E. coli* z rekombinantnimi plazmidi smo ocenili z gelsko elektroforezo izolirane in s *PstI* cepljene plazmidne DNA sevov 1201 C, 1201 D in 1201 E. Uspešne transformante smo ugotovili s pojavom lise na gelu, ki je sovpadala z velikostjo naših vključkov, kar je okvirno 1 kb. Rezultati so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Gelska elektroforeza izolacije plazmidne DNA transformant *E.coli*. Rezultat transformacije celic *E.coli* z rekombinantnimi plazmidi 1201 C, 1201 D, 1201 E. Pozitivni primer je stolpec 3, kjer je opazna lisa, ki sovpada z velikostjo 1 kb. Negativen primer je stolpec 4, kjer takšne lise ni opaziti. Stolpec 1 je velikostna lestvica.

4.2 PREVERJANJE ZAŠČITENOSTI DNA

Z metodami 3.2.12 in 3.2.13. smo zaščitili prenosljivi vektor pred restriktijsko modifikacijskim sistemom seva *P. bryantii* TC1-1. Delo smo preverili z endonukleazo *Sau3AI*. Uspešno zaščitena plazmidna DNA se navkjub cepitvi z endonukleazi na gelu pojavi v krožni obliki. Nezaščitena plazmidna DNA je linearizirana. Torej, če primerjamo rezultate z vektorjem pRH3 na sliki 5 stolpec 2 in 3, lahko sklepamo, da smo dobili linearizirano in krožno obliko plazmidne DNA pRH3. Krožne, zaščitene oblike je dovolj za nadalnje delo. Rezultati so prikazani na sliki 7.

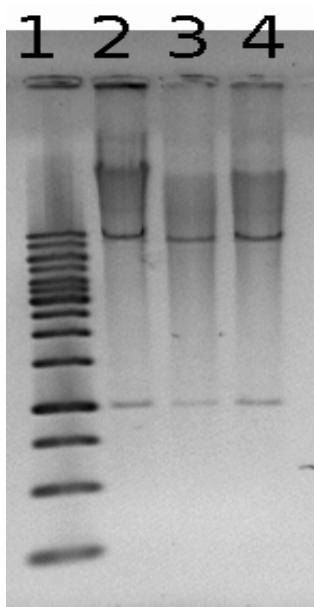


Slika 7: Preverjanje zaščitenosti rekombinantne DNA sevov 1201 C, 1201 D, 1201 E pred restriktijsko modifikacijskim sitemom *P. bryantii* TC1-1 s cepitvijo z endonukleazo *Sau3AI*.

Stolpec 1 prikazuje velikostno lestvico. Stolpci 2, 3 in 4 je zaščitena DNA sevov 1201 C, 1201 D, 1201 E. Stolpec 5 je rezultat iste reakcije z uporabljeno DNA bakteriofaga λ .

4.3 ELEKTROPORACIJA *P. bryantii*

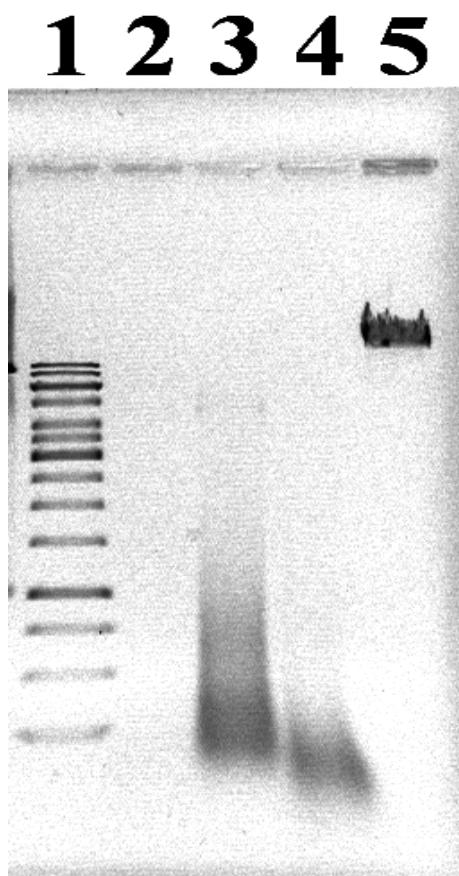
Elektroporacijo, ki smo jo izvedli po metodi opisani v točki 3.2.14 smo preverili z gelsko elektroforezo izolarane in s *PstI* cepljene plazmidne DNA rekombinantnih sevov *P. bryantii* TC1-1. Pri uspešni elektroporaciji morajo biti fragmenti primerljivi s *PstI* cepljenim vektorjem pRH3 iz *E. coli* na sliki 4. Torej lisi veliki 1 kb in 9 kb. Gel na sliki 8 nam pove, da smo uspešno vnesli plazmidno DNA v tarčne celice.



Slika 8: Preverjanje elektroporacije s cepitvijo z endonukleazo *PstI* plazmidne DNA izolirane iz elektroporiranih rekombinantnih celic *P. bryantii* TC1-1 sevov
Stolpec 1 prikazuje velikostno lestvico.
Stolpci 2, 3, 4 so vzorci 1201 C , 1201 D , 1201 E.

4.4 NUKLEAZNA AKTIVNOST SUPERNATANTA

Nukleazno aktivnost supernatanta smo ugotavljali z metodo opisano 3.2.12. Z reakcijsko mešanico smo naredili gelsko elektroforezo. Večja kot je aktivnost supernatanta, manjši bodo nastali fragmenti DNA bakteriofaga λ , ki jih bomo zasledili na elektroforetskemu gelu. V primeru, da je aktivnost zelo visoka, fragmentov ne bomo zaznali. Rezultat, nukleazna aktivnost supernatanta sevov 1201 C, 1201 D in 1201 E je razvidna na sliki 9.



Slika 9: Nukleazna aktivnost supernatantov sevov 1201 C, 1201 D in 1201 E
Stolpec 1 je velikostna lestvica.
Stolpec 2, 3 in 4 so od leve proti desni sevi 1201 E, 1201 D, 1201 C.
Stolpec 5 je necepljena DNA bakteriofaga λ za primerjavo,

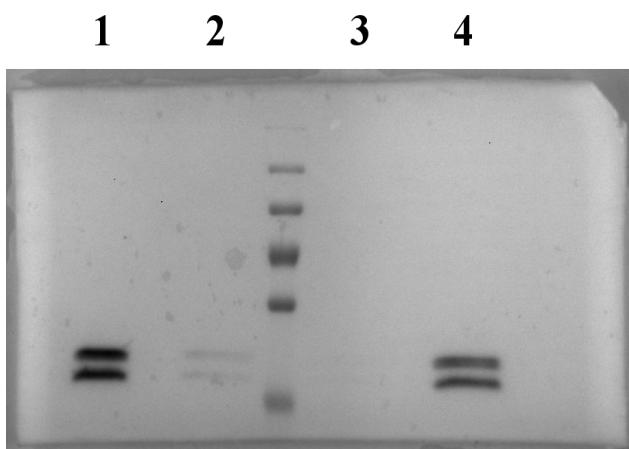
4.5 UGOTAVLJANJE RELATIVNE KOLIČINE PROIZVEDENEGA PROTEINA

Z metodami opisanih v točkah od točke 3.2.16 do 3.2.20 in metodo 3.2.11 smo ocenili, koliko proteina *NucB* so proizvedli sevi s posameznimi konstrukti. Postopek smo ponovili trikrat. Dobljene rezultate smo poleg povprečja in standardnega odklona kvantifikacij predstavili v preglednici 8. Rezultati so podani v odstotkih relativno glede na proizvedeno količino poročevalskega proteina, iz plazmida s kloniranim genom *nucB* iz divjega tipa *P. intermedia* 17 lokus PINA_1201.

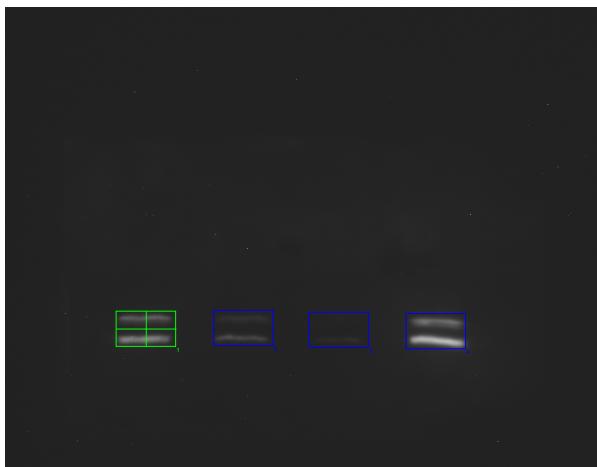
Preglednica 8: Relativna količina proizvedenega proteina *NucB*

	datum meritve			povprečje	st. odklon
	05.10.12	16.10.12	25.07.12		
1201	100	100	100	100	/
1201 C	16,0	10,2	28,2	18,1	9,2
1201 D	7,5	1,9	4,9	4,8	2,8
1201 E	93,0	85,7	162,6	113,7	42,4

Fotografija membrane, na katero smo naredili blot, je prikazan na sliki 10. Pri vsakem sevu sta vidni dve lisi, ki sta glede na velikostno lestvico veliki med 35kDa in 55kDa. Na sliki 11 je prikazano tudi ročno določeno območje kvantifikacije količine zaznanega proteina.



Slika 10: Membrana PVDF z imunodetektiranim proteinom *NucB*
Sestavljen fotografska membrana z imunodetektiranim *NucB* proizvedenim v posameznih sevih. Od leve proti desni 1201, 1201 C, velikostna lestvica, 1201 D, 1201 E.



Slika 11: Prikazano območje uporabljeno za kvantifikacijo reporterskega proteina.

4.6 SEKVENCIRANJE

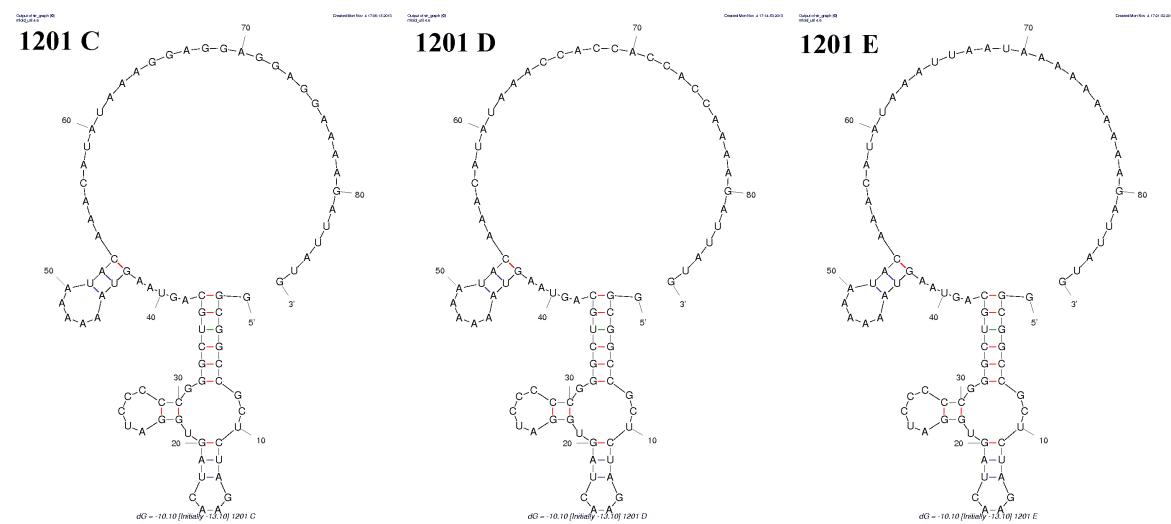
Zaporedja smo obdelali z metodo opisano v točki 3.2.26 in ključni del je prikazan na sliki 12. Zaporedja 1201 C, 1201 D in 1201 E v formatu fasta smo dodali v prilogo.

2_D_kontrnnuc	ATAAACCACCCACCA
3_E_kontrnnuc	ATAAATTAAATAA
1_C_kontrnnuc	ATAAAGGAGGGAGGAGG
1201-KONTRNNUC	ATAAATTAAATAGGAGGGAAAAGATTATGCACACA

Slika 12: Poravnava zaporedij vzorcev 1201 C, 1201 D, 1021 E in 1201.

4.7 SEKUNDARNE STRUKTURE

Program mFOLD (Zuker, 2003) nam je pri privzetih nastavitevah vrnil rezultat, da v območju od -20 nukleotida do start kodona pri nobenem konstruktu ni stabilne sekundarne strukture. Zaporedje je dolgo 86 nt in zajema celotno neprevedeno regijo do start kodona. Pri vseh treh rekombinantnih sevih *P. bryantii* TC1-1 1201 C, 1201 D, 1201 E je bil predviden le en izid. Prikazan je na sliki 13.



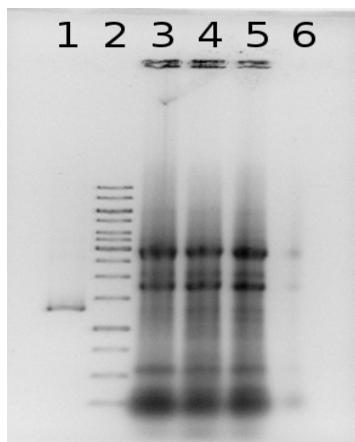
Slika 13: Predvidena enotna sekundarna struktura 5' konca neprevedene regije sevov 1201, 1201 C, 1201 D in 1201 E

4.8 UGOTAVLJANJE STOPNJE TRANSKRIPCIJE POROČEVALNEGA GENA *nucB*

Z metodami opisanimi v poglavjih Izolacija RNA (3.2.21), Ugotavljanje čistosti in koncentracije RNA (3.2.22), Čiščenje vzorca RNA z DNazo (3.2.23), Obratno prepisovanje (3.2.24), Izvedba PCR v realnem času (3.2.25) smo ocenili količino mRNA za poročevalni gen.

4.8.1 Izolacija RNA

Izolirano RNA smo preverili z gelsko elektroforezo cDNA rekombinantnih sevov in rezultat je prikazan na sliki 14. Stolpec 6 je posledica napake pri nalaganju na elektroforezni gel, navkljub temu je vidna istovetnost z ostalimi vzorci, če primerjamo povdarjene lise na gelu. Koncentracijo smo izmerili s spektrofotometrom. Rezultati in izračun so prikazani v preglednici 9.



Slika 14: Preverjanje izolacije RNA z gelsko elektroforezo cDNA rekombinantnih sevov:
 stolpec 1 ni del teh rezultatov,
 stolpec 2 je velikostna lestvica,
 stolpec 3 predstavlja 1201 C,
 stolpec 4 predstavlja 1201 D,
 stolpec 5 predstavlja 1201 E in
 stolpec 6 predstavlja 1201.

Preglednica 9: Meritve in izračuni čistosti ter koncentracije RNA.

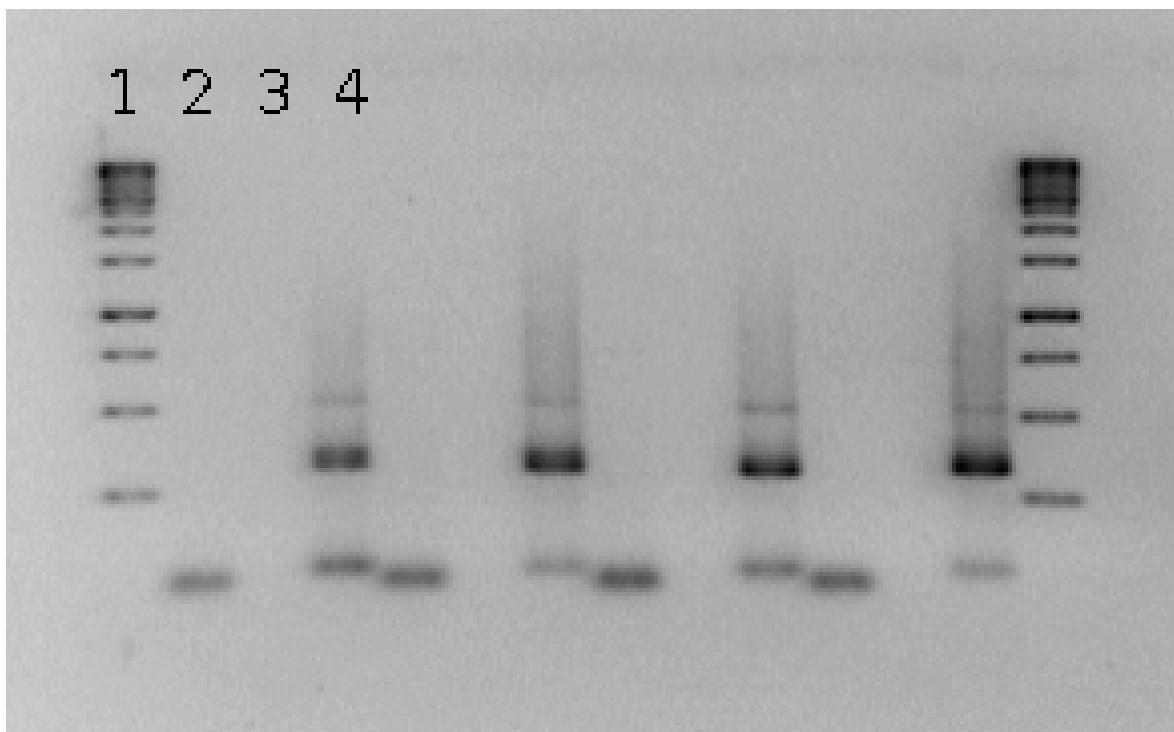
A1 je absorbanca izmerjena pri 260 nm. **A2** je absorbanca izmerjena pri 280 nm.
Ozadje je absorbanca izmerjena pri 320 nm.

	A1	A2	A1-A2	A1/A2	ozadje	V (µL)	c (µg/mL)
1201 C	0,969	0,610	0,359	1,58	0,189	10	
C – ozadje	0,78	0,421	0,359	1,85			1560
1201 D	0,777	0,446	0,331	1,74	0,055	10	
D – ozadje	0,722	0,391	0,331	1,84			1444
1201 E	0,571	0,323	0,248	1,76	0,045	18	
E – ozadje	0,526	0,278	0,248	1,89			584
1201	1,134	0,664	0,470	1,7	0,123	19	
1201-ozadje	1,011	0,541	0,470	1,86			1330

4.8.2 Obratno prepisovanje

Obratno prepisovanje izolirane RNA v cDNA smo preverili z gelsko elektroforezo nastale cDNA, ki smo jo predhodno pomnožili s navadnim PCR pri katerih smo uporabili tarči za gen *nucB* in 16S cDNA. Iz gela na sliki 15 je razvidno:

- da so stolpci v posameznih tripletih (npr. 2,3 in 4) primerljivi med seboj in s tem med vzorci,
- da smo uspešno pomnožili cDNA gena *nucB* (stolpec 2),
- da po 20 ciklih PCR ni prišlo do zaznavnega produkta pri negativni kontroli iz metode opisane v točki 3.2.20 (stolpec 3),
- da smo uspešno pomnožili 16S cDNA (stolpec 4).



Slika 15: Preverjanje obratnega prepisovanja RNA v cDNA z gelsko elektroforezo produktov PCR pri katerih smo uporabili tarči za gen *nucB* in 16S cDNA
 Stolpec 1 je velikostna lestvica.

Stolpec 2 primer opisane reakcije s tarčo za gen *nucB*.

Stolpec 3 primer opisane reakcije brez reverzne trankrsiptaze s tarčo za gen *nucB*.

Stolpec 4 je primer opisane reakcije s tarčo za 16S cDNA.

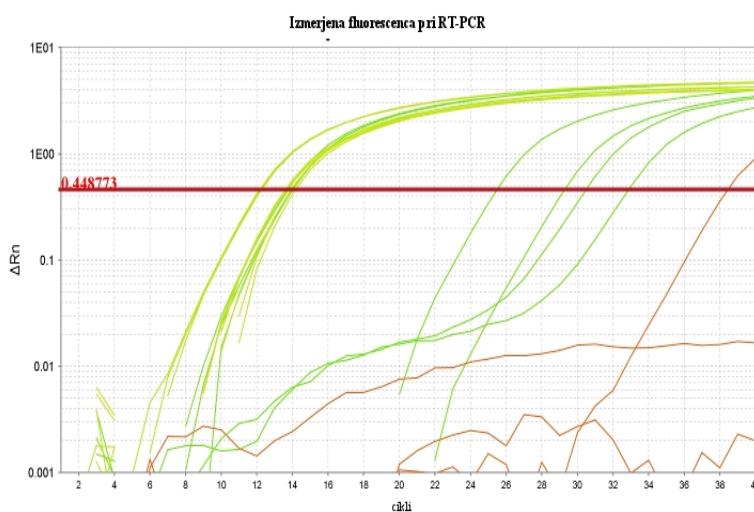
Predstavljen primer (stolpc 2, 3 in 4) je vzorec 1201 C. Preostali vzorci (1201 D, 1201 E in 1201) si na gelu sledijo v tem vrstnem redu v primerljivih tripletih stolpcov.

4.8.3 Ocena relativnega izražanja reporterskega gena *nucB*.

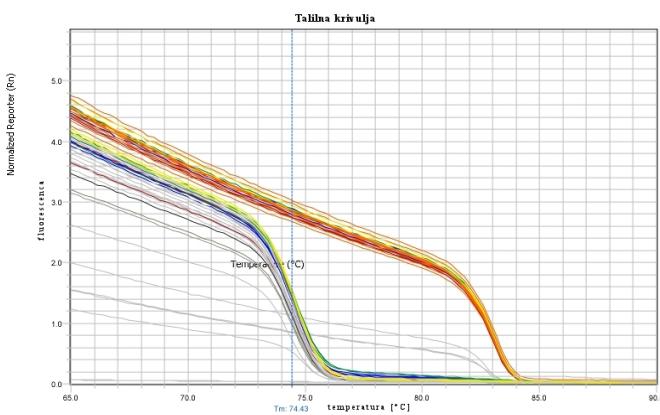
Relativno količino mRNA smo ocenili z rtPCR. Standardna krivulja je bila narejena v trikratnih ponovitvah v razponu od 1 do 0,01 za tarčo *nucB* in od 0,1 do 0,005 za tarčo 16S. Povprečna učinkovitost reakcij za *nucB* je bila 1,89 in za 16S 1,95. Vsi R^2 so bili nad 0,99. Zabeležena količina fluorescence za reakcije brez DNA in reakcije, kjer RNA ni bila prepisana v DNA, niso dale signalov ali pa se je ta pojavil po 22. ciklu je prikazana na sliki 16. Opazna je razlika v ciklih, kjer krivulje prestopijo prag, med vzorci in kontrolami. Talilna krivulja na sliki 17 nam kaže značilna in specifična produkta. Številske rezultate s standardno deviacijo izračunano kot je opisano v metodi 3.2.23 smo prikazali v preglednici 10. Neobdelani podatki rtPCRja oziroma izpiski programov so v prilogah.

Preglednica 10: Relativna ekspresija gena *nucB*

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon
1201 C	1,0	0,3
1201 D	0,7	0,2
1201 E	0,9	0,3



Slika 16: Grafični prikaz izmerjene količine fluorescence pri rtPCR
Rdeča črta predstavlja ročno določen prag, nad katerim je program zabeležil rezultat. Opazna je razlika med krivuljami, ki prestopijo prag okoli 10. cikla, ki predstavljajo reprezentativni del vzorcev in standardno krivuljo ter krivuljami ki prestopijo prag šele po 20. ciklu, ki predstavljajo NTC, ali vzorce, kjer nismo naredili obratnega prepisa.



Slika 17: Talilna krivulja vseh vzorcev pri rtPCR

Razvidna sta dva specifična produkta, ki smo ju dobili z uporabo dveh setov tarč pri PCR celokupne cDNA (16S cDNA in *nucB*).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Aktivnost supernatanta

Večja kot je nespecifična nukleazna aktivnost supernatanta, manjši so delci DNA in hitreje potujejo pri gelski elektroforezi. Torej lahko na podlagih rezulatov iz točke 4.4 je razvidno, da si vzorci po nukleazni aktivnosti supernatanta sledijo v naslednjem vrstnem redu 1201 D<1201 C<1201 E. Vorec 1201 C je razgradil DNA bakteriofaga λ do te mere, da je nismo več zaznali z gelsko elektroforezo. Ponovitev poskusa je dala isti rezultat. Ker se je rezultat skladal s pričakovanji in ker smo ga potrdili z rezultati predstavljenimi v točki 4.5 nismo optimizirali poskusa (npr. več DNA ali krajši čas nukleazne reakcije).

5.1.2 Ugotavljanje relativne količine proizvedenega reporterskega proteina *NucB*

Velikosti lis imunodetektiranih vzorcev 1201 C, 1201 D, 1201 E na membrani, glede na velikostno lestvico, sovpadajo z dosedanjimi raziskavami, ki ocenjujejo velikost na 37 kDa oziroma 42 kDa in pravijo, da je druga, večja lisa verjetno postranslacijsko modificiran protein (Accetto in Avguštin, 2007). Torej smo za kvantifikacijo upoštevali obe lis. Iz rezultatov opisanih v točki 4.5 sklepamo, da imata vzorca 1201 C in 1201 D opazno nižjo količino proizvedenega proteina. Vzorec E je primerljiv s standardom. Standardni odklon pri 1201 E je zelo velik, ker smo zaradi manjšega števila vzorcev, in ker je bilo razmerje med vzorci med poskusi podobno, vključili tudi podatek, ki je kazal na osamelca. Po količini proizvedenega proteina si vzorci sledijo 1201 D<1201 C<1201 E.

5.1.3 Izolacija RNA

Na podlagi rezultatov iz točke 4.8.1 sklepamo, da je enako uspela pri vseh štirih vzorcih, navkljub temu, da je količina z agarozno gelsko elektroforezo zaznane cDNA v stolcu 6 precej manj kot v primerljivih stolcih 3,4 in 5. Problem je nastal pri nalaganju vzorca na agarozni gel, ker nismo uspeli obdržati celotnega vzorca v jamici. Vzorec 1201 je navkljub temu primerljiv z ostalimi vzorci. To sklepamo iz razporeditve lis. Količino vzorca smo za nadaljnji postopek izenačili s pomočjo rezultatov v preglednici 9.

5.1.4 Ugotavljanje relativne ekspresije proteina

Iz vrednosti p, ki nam jih je podal REST 2009, smo sklepali, da vzorca C in E nista različna od standarda, medtem ko je pri vzorcu D prišlo do nižje stopnje transkripcije. Ta rezultat bomo upoštevali v naslednji točki, čeprav verjetno ni signifikanten, ker *in vivo* težko določimo majhne razlike v ekspresiji. Izpiski iz programa so prikazani v prilogi C.

5.1.5 Normalizacija količine proteina s količino mRNA

Količino proteina smo delili s količino mRNA in s tem upoštevali vpliv različne transkripcije, ki nam jo je prikazal program REST. Izpiski programa so v prilogah. Normalizacija vseh sevov je podana v preglednici 11 in v preglednici 12 je normaliziran le vzorec 1201 D. Opazen je porast standardne napake. Sklepi sovpadajo z ugotovitvam pri 5.1.2, le razlika med C in D se je še pomanjšala. Torej si vzorci po proizvedeni količini poročevalskega gena nucB sledijo 1201=1201 E>1201 C=1201 D.

Preglednica 11: Relativna količina proteina *NucB* normalizirana s količino mRNA.

Vzorec	Dejanska razlika	St. odklon
1201 C	19	11
1201 D	7	4
1201 E	129	69

Preglednica 12: Relativna količina proizvedenega proteina *NucB* II. Normaliziran je le vzorec 1201 D.

Vzorec	Dejanska razlika	St. odklon
1201 C	18	9
1201 D	7	4
1201 E	114	42

5.2 SKLEPI

Če primerjamo razlike v zaporedju, lahko v odsotnosti sekundarnih struktur ovrednotimo 5' neprevedeno regijo mRNA v iniciaciji translacije bakterije *Prevotella bryantii* TC1-1 in sklepamo:

- da mehanizem iniciacije translacije ne razlikuje med gvaninom in citozinom, ker sta vzorca C in D primerljiva.
- da je frekvenca iniciacije translacije večja, če je na mestih od -19 do -8 relativno glede na start kodon več baznih parov med adeninom in citozinom kot pa med gvaninom in citozinom. To sklepamo, ker se je pri vzorcema 1201 in E izrazilo več proteina kot pri vzorcema C in D. Kar sovpada z lastnostjo ribosomskega protina S1, da veže poli-U in poli-A mesta na zaporedju in z njegovo vlogo pri iniciaciji.
- da citozini in gvanini na mestih od -8 do -12 relativno glede na start kodon ne vplivajo na frekvenco iniciacije translacije. To sklepamo, ker sta seva 1201 in 1201E primerljiva. Kar sovpada z načinom postopne vezave ribosomskega proteina S1 na mRNA.

6 POVZETEK

Izvršili smo zadane cilje naloge. Kot je razvidno iz rezultatov 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, smo uspešno vnesli in izrazili rekombinantne plazmide, ki so nosili gen za nespecifično nukleazo *NucB* v *P. bryantii* TC1-1. Vsak izmed treh vzorcev je imel različno spremenjeno regijo zaporedja v 5' UTR proteina. Potrdili smo, da je sprememba v količini proteina med našimi vzorci res posledica spremenjenega zaporedja. Razlike med vzorci pri transkripciji smo izmerili pri rezultatih 4.8 in morebitno razliko ovrednotili pri razpravi 5.1.5. Zaporedje smo preverili s sekvenciranjem, razvidno pri rezultatih 4.6. Hkrati smo z dobljenimi zaporedji in algoritmom mFOLD preverili in potrdili odsotnost sekundarnih struktur, rezultati 4.7. Tako smo lahko s primerjavo dobljene razlike v količini proizvedenega proteina potrdili delovno hipotezo, da obogatitev regije od -20 do -9 relativno na start kodon v mRNA gena *nucB* z adeninom in uracilom pozitivno vpliva na frekvenco iniciacije in da mehanizem ne dela razlik med gvaninom in citozinom. Kar sovpada s količino dvojnih oz. trojnih vezi in z njimi povezana stabilnostjo sekundarnih struktur mRNA. Ta je manjša v zaporedji z manjšo količino GC parov. Lokalno enoverižna zaporedja omogočajo delovanje ribosomalnega proteina S1, ki veže, razklene in dodatno linearizira ta zaporedja dolga okvirno 11 nt. Tako ribosom pridobi dostop do start kodona in s tem je posledično višja frekvenca iniciacije prevajanja proteinov. Ta mehanizem iniciacije se je do danes ohranil pri *Bacteroidetes*, medtem ko pri večini ostalih k razvijanju sekundarnih struktur dodatno pripomore zaporedje SD. Pri ostalih tudi ni opaziti značilnega padca gvanina in citozina v regiji pred start kodonom in loga adenina in timina na okvirnem mestu -12, ki ga lahko pripišemo postopni vezavi proteina S1 na mRNA in s »standby« položajem 30S podenote. S tem sovpada tudi v rezultatih ugotovljena neobčutljivost mehanizma iniciacije translacije na dodatne vodikove vezi na mestih od -8 do -13 relativno glede na start kodon.

7 VIRI

Accetto T., Avguštin G. 2007. Studies on *Prevotella* nuclease using a system for the controlled expression of cloned genes in *P. bryantii* TC1-1. *Microbiology*, 153, 7: 2281-2288

Accetto T., Avguštin G. 2011. Inability of *Prevotella bryantii* to form a functional Shine-Dalgarno interaction reflects unique evolution of ribosome binding sites in bacteroidetes. *PLoS ONE*, 6, 8: doi: 10.1371/journal.pone.0022914: 9 str.

Accetto T., Peterka M., Avguštin G. 2005. Type II restriction modification systems of *Prevotella bryantii* TC1-1 and *Prevotella ruminicola* 23 strains and their effect on the efficiency of DNA introduction via electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 247, 2: 177-183

Avery P. 2013. Real time PCR A useful new approach? Statistical sroblems? Newcastle, School of Mathematics and Statistics, University of Newcastle: 21 str.
www.gene-quantification.de/avery-rel-pcr-errors.pdf (september 2013)

Avguštin G., Wallace R. J., Flint H. J. 1997. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 2: 284-288

Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. *Journal of Bacteriology*, 62, 3: 293-300

Bryant M. P., Small N., Bouma C., Chu H. 1958. *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amylolytica* the new genus and species species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 76, 1: 15-23

Caldwell D. R., Bryant M. P. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Applied Microbiology*, 14, 5: 794-801

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 vulgatus*, *Bacteroides uniformis* and *Prevotella ruminicola*. Journal of Applied Microbiology, 79, 4: 417-424

de Smit M. H., van Duin J. 2003. Translational standby sites: How ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. Journal of Molecular Biology, 331, 4: 737-743

Counotte GH, van't Klooster AT, van der Kuilen J, Prins RA. 1979. An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle. Journal of Animal Science, 49, 6: 1536-1544

DSMZ 2007. 330. Rumen bacteria medium. Braunschweig, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen: 1 str.
http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium330.pdf (januar 2013):

Hajnsdorf E., Boni I. V. 2012. Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. Biochimie, 94, 7: 1544-1553

Hobson P. N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Norris J. R., Ribbons. D.W. (eds.). London, Academic Press: 133-149

Hobson P.N., Steward C. S. 1997. Rumen microbial ecosystem 2nd. London, Blackie Academic & Professional: 712 str.

Hogan R. 2006. How to combine errors. Reading, University of Reading: 2 str.
www.met.rdg.ac.uk/~swrhgnrj/combining_errors.pdf (september 2013)

Invitrogen 2012. trizol_reagent-15596-026. Carlsbad, Invitrogen: 4 str.
www.lifetechnologies.com (november 2013)

Kozak M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. Gene, 361:13-37

Laursen B. S., Sørensen H. P., Mortensen K. K., Sperling-Petersen H. U. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 1: 101-123

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. ClustalW and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948

Marino J. H., Cook P., Miller K. S. 2003. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *Journal of Immunological Methods*, 283, 1-2: 291-306

Nakagawa S., Niimura Y., Miura K.-I., Gojobori T. 2010. Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14: 6382-6387

Pfaffl M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. v: A-Z of quantitative PCR. Bustin S. A. (ed.). San Diego, International University Line: 89-113

Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30,9: e36, doi: 10.1093/nar/30.9.e36: 10 str.

Purushe J., Fouts D. E., Morrison M., White B. A., Mackie R. I., Coutinho P. M., Henrissat B., in Nelson K. E. 2010. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: Insights into their environmental niche. *Microbial Ecology*, 60, 4: 721-729

Qu X., Lancaster L., Noller H. F., Bustamante C., Tinoco I. 2012. Ribosomal protein S1 unwinds double-stranded RNA in multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 36: 14458-14463

Salah P., Bisaglia M., Aliprandi P., Uzan M., Sizun C., Bontems F. 2009. Probing the relationship between gram-negative and gram-positive S1 proteins by sequence analysis. Nucleic Acids Research, 37, 16: 5578-5588

Schluelzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. Cell, 102, 5: 615-623

Schneider T. D., Stephens R. M. 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucleic Acids Research, 18, 20: 6097-6100

Sengupta J., Agrawal R. K., Frank J. 2001. Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 21: 11991-11996

Shah H. N., Collins D. M. 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 2: 205-208

Sørensen M. A., Fricke J., Pedersen S. 1998. Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* *in vivo*. Journal of Molecular Biology, 280, 4: 561-569

Thomas F., Hehemann J.-H., Rebiffet E., Czjzek M., Michel G. 2011. Environmental and gut *Bacteroidetes*: The food connection. Frontiers in Microbiology, 2: 93, 10.3389/fmicb.2011.00093: 16 str.

Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M. E., Suzuki, K., in Ludwig, W. 2012. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 5: The *Actinobacteria*. Berlin, Springer: 2106 str.

Wower I. K., Jahan N., Zwieb C., Wower J. 2013. Ribosomal protein S1: An important trans-translational factor. Biochemistry & Physiology, S2:00:, doi:10.4172/2168-9652.S2-001: 7 str.

Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acid Research, 31, 13: 3406-3415

ZAHVALA

Hvala vsem podpisanim in nepodpisanim za potrpljenje.

PRILOGE

PRILOGA A: Rezultati sekvenciranja gena *nucB* vseh treh sevov

Sev 1201 C

>1_C_kontrnnuc

```
NTNTATCCCGCANGACGNAAAGATAAACTTTATTCATGTTCCAAAAATC  
AATGTCATAAAATAATGGAGCGGTAGGAAATTCTATAAGGCAATACA  
GTTGGGATATATACTTATCTCCATTCTTATCGGATGTATGGCATATAATA  
GCCTCTATGAATGGCAGGAGATAGAACGATTAGAACCTGGCAATAAAAAAA  
ATAGACGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAACTAGTGGATCCCC  
CGGGCTGCAGTAAGTAAAAAATACAAACATATAAAGGAGGAGGAGGAAAAA  
GATTATGCACACAATTAAATCTTATTAGCCATGGCGTATTAGCTC  
TGGTTGCTTGCAGTAGTAATGACGATAATTCAACATCTACATCTGGG  
CCTTCCGCTTCTAATGAAATGCCAACATACCAACAGCAAGCATGAAATA  
TATTGGCGATTAGAGTTCCGAAGGTAAAAGGAGGTAATAGCATTATCA  
TCAGCCACCTTGATGGCGATTCTCTCAACTACTCCATAGAACGGACACC  
GAAAAGAAATCCAACCGATGGTCTGCTATAAAATGTATTGGAGTAACCG  
ACTCTCACGTACCACACGCTATTATGGTAGCCCACAGTATCCATCCGATC  
CTGACATGAACAGTAGCTATCAATATAGCGTTGATAACGATCCGTTGGG  
GATATTAAGTATGACCATTGCCATCTTGTCCCTCTGCTGATCGTTGAA  
TTCAGCAAATTCCAACCAACCTTCTATCTTACCAACATGCAGCCAC  
AAGCTCACTCGTTCAACGCTGGTATCTGGAATGATATGGAAAGCTTAATT  
CGTTCATGGATTACAGTTAATTCCAGTCATTCTGATACGTTATATGTTG  
CAAAGGTGGTACTATTGACAAGTCAACAGATATATTACGACGACAAGCA  
AAGGGCTTCTTGTGCCAAGAtATTATTTCTGCTgtaTTGATGAANAA
```

Sev 1201 D

>2_D_kontrnnuc

TATCCGCATNNNGNAAAGATAAACTTTATTCATGTTCCAAAAATCAATG
TCATCAAAATAATGGAGCGGTCAAGGAAATTCTATAAGGCAATACAGTTG
GGATATATACTTATCTCCATTCTTATCGGATGTATGGCATATAATAGCCT
CTATGAATGGCAGGAGATAGAACGATTAGAACCTGGCAATAAAAAAATAG
ACGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTAGAACACTAGTGGATCCCCGGG
CTGCAGTAAGTAAAAAATACAAACATATAAACACCACCAAAAGATT
ATGCACACAATTAAATCTTATTAGCCATGGCGTATTAGCTCTGGT
TGCTTGCAGTAGTAATGACGATAATTCAACATCTACATCTGGCCTT
CCGCTCTAAATGCAACATACCAACAGCAAGCATGAAATATATT
GGCGATTAGAGTTCCGAAGGTAAAAGGAGGTAATAGCATTATCATCAG
CCACCTTGATGGCGATTCTCAACTACTCCATAGAACGGACACCGAAA
AGAAATCCAACCGATGGCTTGCTATAAAATGTATTGGAGTAACCGACTC
TCACGTACCACACGCTATTATGGTAGCCCACAGTATCCATCCGATCCTGA
CATGAACAGTAGCTATCAATATAGCGTTGATAACGATCCGTTGGGATA
TTAAGTATGACCATGCCATCTTGTCCCTCTGCTGATCGTTGAATTCA
GCAAATTCAAACCTACCAAAACCTTCTATCTTACCAACATGCAGCCACAAGC
TCACTCGTTAACGCTGGTATCTGGAATGATATGGAAAGCTTAATTGTT
CATGGATTACAGTTAATTCCAGTCATTCTGATACGTTATATGTTGCAA
GGTGGTACTATTGACAAGTCAACAGATATATTACGACGACAAGCAAAGG
GCTTCTTgtGCCAAGATATTATTTCTGCTGTATTGATGAAnAACTCTT
CTGGCTATGAAGCTATTGGCTTTGGTCgACCAAACTNNTTCAGCATCT
AANCAGGGAANNNTG

Sev 1201 E

>3_E_kontrnnuc

NGNNNACTTTATTCATGTTCCAAAAATCAATGTCATCAAAATAATGGA
GCGGTCAAGAAATTCTATAAGGCAATACAGTTGGGATATACTTATCT
CCATTCTTATCGGATGTATGGCATATAATAGCCTCTATGAATGGCAGGAG
ATAGAACATTAGAACTTGGCAATAAAAAAATAGACGAGCTCCACCGCGG
TGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGTAAGTAAAAA
ATACAAACATATAAATTAAATAAAAAAAAAAGATTATGCACACAATTAAAT
CTTTATTTAGCCATGGCGTATTAGCTCTGGTTGCTGCGGCAGTAGT
AATGACGATAATTCAACATCTACATCTGGCCTTCCGCTTAATGTAAA
TGCCAACATACCAACAGCAAGCATGAAATATATTGGCGATTAGAGTTTC
CGAAGGTAAAAGGAGGTAATAGCATTATCATCAGCCACCTTGATGGCGAT
TCTCTCAACTACTCCATAGAATGGACACCAGAAAGAAATCCAACCGATG
GTCTTGCTATAAAATGTATTGGAGTAACCGACTCTCACGTACCAACACGCT
ATTATGGTAGCCCACAGTATCCATCCGATCCTGACATGAACAGTAGCTAT
CAATATAGCGTTGATAACGATCCGTTGGGATATTAAGTATGACCATGG
CCATCTTGCTCCCTCTGCTGATCGTTGAATTCAAGCAAATTCCAACCTACC
AACCTTCTATCTTACCAACATGCAGGCCACAAGCTCACTCGTTCAACGCT
GGTATCTGGAATGATATGGAAAGCTTAATCGTTCATGGATTACAGTTAA
TTCCAGTCATTCTGATACGTTATATGTTGCAAAGGTGGTACTATTGACA
AGTCAACAGATATATTACGACGACAAGCAAAGGGCTTCTGTGCCAAGA
TATTATTTCTGCTGNATTGATNNNNAACTCTTCTGGNTATAAA

PRILOGA B: Podatki relativnih izražanj reporterskega gena po posameznih dnevih vseh treh sesov

rezultati 24.1.2013

Biological Replicate Reference Sample Name

Chemistry SYBR® Green Reagents	Učinkovitost
Created By len	nucB 95,040
Description	16S 86,020
Endogenous 16S	
Instrument ViiA 7	
Last Modif Mon Jun 17 02:31:13 CEST 2013	
Number of 1	
Quantification Ct	
RQ Standard 1	
Reaction V 20.0	
Study Name nucB 16S C D E 1201	
Study Type RQ	
Technical F 1201 (1)	

Sample	Na Target	Nan	Task	Omitted	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct Mean	Normalized Quantity Mean	Normalized Quantity SD
-RT 1201 (16S			false						
-RT c (2)	16S			false						
-RT d (2)	16S			false						
-RT e (2)	16S			false						
1201 (1)	16S			false				11,840		
16S 1201 (16S			false						
C (1)	16S			false				11,467		
D (1)	16S			false				11,154		
E (1)	16S			false				10,145		
-RT 1201 (nuc B			false						
-RT c (2)	nuc B			true						
-RT d (2)	nuc B			false						
-RT e (2)	nuc B			true						
1201 (1)	nuc B			false	1,000	0,920	1,087	13,636	0,172	1,087
16S 1201 (nuc B			false						
C (1)	nuc B			false	0,866	0,825	0,908	13,505	0,149	1,050
D (1)	nuc B			false	0,569	0,518	0,625	13,842	0,098	1,098
E (1)	nuc B			false	0,951	0,895	1,011	12,136	0,164	1,063

Biological Replicate Reference Sample Name		SYBR® Green Reagents		Reporter	SyberGreen						
Chemistry	len	Quencher	Automatic Ct Threshold	NONE							
Created By		Automatic Baseline	FALSE	FALSE							
Description		Baseline Start	1	FALSE							
Endogenous Control Target Name	16S	Baseline End	5	FALSE							
Instrument Type	ViiA 7	Učinkovitost									
Last Modified Date	Mon Jun 17 02:31:12 CEST 2013	Ct	16S	86,020							
Number of Experiments	1	1	nucB	95,040							
Quantification Cycling Method											
RQ STAN Deviation Multiplier											
Reaction Volume	20.0										
Study Name	L nucB 16S C D E 1201										
Study Type	RQ										
Technical Replicate Reference Sample Name	1201 (1)										
Omitted	Sample	Target	Task	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Normalized Quantity M	Normalized Quar	Ct Threshold
FALSE	16S	NTC					32,972				0,267
FALSE	16S	NTC					34,720				0,267
FALSE	16S	NTC					33,774				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					8,208				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					8,154				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					8,242				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					10,512				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					10,516				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					10,545				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					11,488				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					11,620				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					11,550				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					12,384				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					12,673				0,267
FALSE	16S 1201 (:16S	STAN					12,546				0,267
FALSE C (1)	16S	UNKN					11,469	11,467			0,267
FALSE C (1)	16S	UNKN					11,406	11,467			0,267
FALSE C (1)	16S	UNKN					11,525	11,467			0,267
FALSE D (1)	16S	UNKN					11,034	11,154			0,267
FALSE	nuc B	NTC					Undetermined				0,449
FALSE	nuc B	NTC					Undetermined				0,449
FALSE	nuc B	NTC					Undetermined				0,449
FALSE	nuc B	STAN					16,564				0,449
FALSE	nuc B	STAN					16,730				0,449
FALSE	nuc B	STAN					17,680				0,449
FALSE	nuc B	STAN					17,866				0,449
FALSE	nuc B	STAN					17,840				0,449
FALSE	nuc B	STAN					20,145				0,449
TRUE -RT c (2)	nuc B	UNKN									
FALSE -RT d (2)	nuc B	UNKN					36,108				0,449
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN					11,808	11,840			0,267
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN					11,736	11,840			0,267
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN					11,975	11,840			0,267
FALSE	nuc B	STAN					14,184				0,449
FALSE	nuc B	STAN					14,204				0,449
FALSE	nuc B	STAN					16,632				0,449
FALSE	nuc B	STAN					20,256				0,449
FALSE	nuc B	STAN					20,324				0,449
FALSE 1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,920	1,087	13,579	13,636	0,172	1,087	0,449	
FALSE 1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,920	1,087	13,679	13,636	0,172	1,087	0,449	
FALSE 1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,920	1,087	13,649	13,636	0,172	1,087	0,449	
FALSE C (1)	nuc B	UNKN	0,866	0,825	0,908	13,507	13,505	0,149	1,050	0,449	
FALSE C (1)	nuc B	UNKN	0,866	0,825	0,908	13,550	13,505	0,149	1,050	0,449	
FALSE C (1)	nuc B	UNKN	0,866	0,825	0,908	13,458	13,505	0,149	1,050	0,449	
FALSE D (1)	16S	UNKN					11,106	11,154			0,267
FALSE D (1)	16S	UNKN					11,321	11,154			0,267
FALSE D (1)	nuc B	UNKN	0,569	0,518	0,625	13,860	13,842	0,098	1,098	0,449	
FALSE E (1)	16S	UNKN					10,115	10,145			0,267
FALSE E (1)	16S	UNKN					10,180	10,145			0,267
FALSE E (1)	16S	UNKN					10,141	10,145			0,267
FALSE	nuc B	STAN					13,523				0,449
FALSE	nuc B	STAN					13,507				0,449
FALSE	nuc B	STAN					13,305				0,449
FALSE	nuc B	STAN					14,208				0,449
FALSE -RT 1201 (2)	nuc B	UNKN					36,771				0,449
TRUE -RT e (2)	nuc B	UNKN									
FALSE D (1)	nuc B	UNKN	0,569	0,518	0,625	13,816	13,842	0,098	1,098	0,449	
FALSE D (1)	nuc B	UNKN	0,569	0,518	0,625	13,849	13,842	0,098	1,098	0,449	
FALSE E (1)	nuc B	UNKN	0,951	0,895	1,011	12,214	12,136	0,164	1,063	0,449	
FALSE E (1)	nuc B	UNKN	0,951	0,895	1,011	12,044	12,136	0,164	1,063	0,449	
FALSE E (1)	nuc B	UNKN	0,951	0,895	1,011	12,149	12,136	0,164	1,063	0,449	

rezultati 25.1.2013

Biological Replicate Reference Sample Name
Chemistry SYBR® Green Reagents

Created By len Učinkovitost
Description 16S 86,020
Endogenou 16S nucB 95,040

Instrument ViA 7
Last Modifi Mon Jun 17 02:32:45 CEST 2013

Number of 1

Quantificati Ct

RQ Standa 1

Reaction V 20.0

Study Nam L nucB 16S C D E 1201

Study Type RQ

Technical F 1201 (1)

Sample Na	Target Na	Task	Omitted	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct Mean	Normalized Quantity Mean	Normalized Quantity SD
-RT 1201 (16S		false						
-RT 1201 (nuc B		true						
-RT c (2)	16S		false						
-RT c (2)	nuc B		true						
-RT d (2)	16S		false						
-RT d (2)	nuc B		true						
-RT e (2)	16S		false						
-RT e (2)	nuc B		true						
1201 (1)	16S		false				11,719		
1201 (1)	nuc B		false	1,000	0,900	1,111	13,837	0,140	1,111
16S 1201 (16S		false						
16S 1201 (nuc B		false						
C (1)	16S		false				11,353		
C (1)	nuc B		false	0,751	0,686	0,823	13,925	0,105	1,096
D (1)	16S		false				11,041		
D (1)	nuc B		false	0,799	0,746	0,857	13,542	0,112	1,072
E (1)	16S		false				9,934		
E (1)	nuc B		false	1,054	1,009	1,101	12,099	0,147	1,045

Biological Replicate Reference Sample Name		Reporter	SyberGreen
Chemistry	SYBR® Green Reagents	Quencher	NONE
Created By	Ilen	Automatic Ct Threshold	FALSE
Description		Automatic Baseline	FALSE
Endogenous Control Target Name	16S	Baseline Start	1
Instrument Type	ViiA 7	Baseline End	5
Last Modified Date	Mon Jun 17 02:32:45 CEST 2013	Učinkovitost	
Number of Experiments	1	16S	86,020
Quantification Cycling Method	Ct	nucB	95,040
RQ STAN Deviation Multiplier	1		
Reaction Volume	20.0		
Study Name	L nucB 16S C D E 1201		
Study Type	RQ		

Technical Replicate Reference Sample Nan 1201 (1)

Omitted	Sample	Target	Reporter RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Normalized Ct	Normalized Threshold
FALSE		16S	NTC			36,312		0,267	
FALSE		16S	NTC			34,910		0,267	
FALSE		16S	NTC			36,187		0,267	
FALSE		nuc B	STAN			12,087		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			12,046		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			12,041		0,449	
TRUE		nuc B	STAN						
TRUE		nuc B	STAN						
FALSE		nuc B	STAN			13,342		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			16,670		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			15,934		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			16,158		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			19,500		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			19,757		0,449	
FALSE		nuc B	STAN			19,742		0,449	
TRUE -RT 1201 (2)		nuc B	UNKN						
TRUE -RT c (2)		nuc B	UNKN						
TRUE -RT d (2)		nuc B	UNKN						
TRUE -RT e (2)		nuc B	UNKN						
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN				11,663	11,719	0,267	
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN				11,738	11,719	0,267	
FALSE 1201 (1)	16S	UNKN				11,757	11,719	0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				7,173		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				7,178		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				7,252		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				9,468		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				9,473		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				9,385		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				10,449		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				10,536		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				10,505		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				11,348		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				11,535		0,267	
FALSE 16S 1201 (:16S)		STAN				11,671		0,267	
FALSE C (1)	16S	UNKN				11,292	11,353	0,267	
FALSE C (1)	16S	UNKN				11,390	11,353	0,267	
FALSE C (1)	16S	UNKN				11,378	11,353	0,267	
FALSE	nuc B	NTC				Undetermined		0,449	
FALSE	nuc B	NTC				Undetermined		0,449	
FALSE	nuc B	NTC				38,346		0,449	
FALSE	nuc B	STAN				17,305		0,449	
FALSE	nuc B	STAN				17,252		0,449	
FALSE	nuc B	STAN				17,703		0,449	
FALSE 1201 (1)		nuc B	UNKN	1,000	0,900	1,111	13,662	13,837	0,140
FALSE 1201 (1)		nuc B	UNKN	1,000	0,900	1,111	13,927	13,837	0,140
FALSE 1201 (1)		nuc B	UNKN	1,000	0,900	1,111	13,922	13,837	0,140
FALSE C (1)		nuc B	UNKN	0,751	0,686	0,823	13,840	13,925	0,105
FALSE C (1)		nuc B	UNKN	0,751	0,686	0,823	13,863	13,925	0,105
FALSE C (1)		nuc B	UNKN	0,751	0,686	0,823	14,072	13,925	0,105
FALSE D (1)		16S	UNKN				10,992	11,041	
FALSE D (1)		16S	UNKN				11,147	11,041	
FALSE D (1)		16S	UNKN				10,985	11,041	
FALSE D (1)		nuc B	UNKN	0,799	0,746	0,857	13,497	13,542	0,112
FALSE D (1)		nuc B	UNKN	0,799	0,746	0,857	13,610	13,542	0,112
FALSE D (1)		nuc B	UNKN	0,799	0,746	0,857	13,519	13,542	0,112
FALSE E (1)		16S	UNKN				9,882	9,934	
FALSE E (1)		16S	UNKN				9,966	9,934	
FALSE E (1)		16S	UNKN				9,952	9,934	
FALSE E (1)		nuc B	UNKN	1,054	1,009	1,101	12,054	12,099	0,147
FALSE E (1)		nuc B	UNKN	1,054	1,009	1,101	12,088	12,099	0,147
FALSE E (1)		nuc B	UNKN	1,054	1,009	1,101	12,154	12,099	0,147
FALSE E (1)		nuc B	UNKN	1,054	1,009	1,101	12,099	12,099	0,145

rezultati 29.1.2013

Biological Replicate Reference Sample Name
Chemistry SYBR® Green Reagents

Created By len
Description Učinkovitost
Endogenou 16S 16S 98,850
Instrument ViiA 7 nucB 90,410

Last Modifi Mon Jun 17 02:34:45 CEST 2013
Number of 1

Quantificat Ct
RQ Confide 95.0
Reaction V 20.0
Study Nam L nucB 16S C D E 1201
Study Type RQ
Technical F 1201 (1)

Sample Na Target Nar Task	Omitted	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct Mean	Normalized Quantity Mean	Normalized Quantity SE
-RT 1201 (- 16S	false						
-RT 1201 (- nuc B	true						
-RT c (2) 16S	false						
-RT c (2) nuc B	true						
-RT d (2) 16S	false						
-RT d (2) nuc B	true						
-RT e (2) 16S	false						
-RT e (2) nuc B	true						
1201 (1) 16S	false				11,894		
1201 (1) nuc B	false	1,000	0,838	1,193	15,933	0,124	1,066
16S 1201 (- 16S	false						
16S 1201 (- nuc B	false						
C (1) 16S	false				11,735		
C (1) nuc B	false	1,253	1,167	1,345	15,412	0,156	1,026
D (1) 16S	false				11,015		
D (1) nuc B	false	0,749	0,676	0,829	15,444	0,093	1,037
E (1) 16S	false				10,452		
E (1) nuc B	mixed	0,871	0,604	1,257	14,607	0,108	1,122

Biological Replicate Reference Sample Name		SYBR® Green Reagents		Reporter	SyberGreen						
Chemistry		Quencher		NONE							
Created By		Automatic Ct Threshold		TRUE							
Description		Automatic Baseline		TRUE							
Endogenous Control Target Name		16S	Baseline Start		1 do 3						
Instrument Type		ViiA 7	Baseline End		3 od 7						
Last Modified Date		Mon Jun 17 02:34:44 CEST 2013	Učinkovitost								
Number of Experiments		1	16S		98,850						
Quantification Cycling Method		Ct	nucB		90,410						
RQ Confidence		95.0									
Reaction Volume		20.0									
Study Name		L nucB 16S C D E 1201									
Study Type		RQ									
Technical Replicate Reference Sample Name		1201 (1)									
Omitted	Sample	Target	Task	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Normalized Qu	Normalized Normalized Ct	Normalized Ct Threshold
FALSE		16S	NTC				36,146				0,288
FALSE		16S	NTC				36,632				0,288
FALSE	1201 (1)	16S	UNKN				11,918	11,894			0,288
FALSE	1201 (1)	16S	UNKN				12,027	11,894			0,288
FALSE	1201 (1)	16S	UNKN				11,738	11,894			0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		NTC				37,260				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				7,114				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				7,530				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				9,888				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				9,969				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				10,991				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				11,155				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				11,079				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				12,290				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				12,519				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				12,445				0,288
FALSE	C (1)	16S	UNKN				11,711	11,735			0,288
FALSE	D (1)	16S	UNKN				10,980	11,015			0,288
FALSE	D (1)	16S	UNKN				10,966	11,015			0,288
FALSE	D (1)	16S	UNKN				11,100	11,015			0,288
FALSE		nuc B	NTC				34,386				0,199
FALSE		nuc B	STAN				16,546				0,199
FALSE		nuc B	STAN				16,683				0,199
FALSE		nuc B	STAN				18,816				0,199
FALSE		nuc B	STAN				19,001				0,199
FALSE		nuc B	STAN				18,980				0,199
FALSE		nuc B	STAN				22,400				0,199
FALSE		nuc B	STAN				22,394				0,199
FALSE		nuc B	STAN				22,220				0,199
FALSE		nuc B	STAN				19,938				0,199
FALSE		nuc B	STAN				19,967				0,199
FALSE		nuc B	STAN				20,014				0,199
TRUE	-RT c (2)	nuc B	UNKN								
FALSE	1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,838	1,193	15,851	15,933	0,124	1,066	0,199
FALSE	1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,838	1,193	15,973	15,933	0,124	1,066	0,199
FALSE	1201 (1)	nuc B	UNKN	1,000	0,838	1,193	15,973	15,933	0,124	1,066	0,199
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				9,954				0,288
FALSE	16S 1201 (:16S		STAN				7,602				0,288
FALSE	C (1)	16S	UNKN				11,764	11,735			0,288
FALSE	C (1)	16S	UNKN				11,729	11,735			0,288
FALSE		nuc B	NTC				Undetermined				0,199
FALSE		nuc B	NTC				Undetermined				0,199
FALSE	C (1)	nuc B	UNKN	1,253	1,167	1,345	15,370	15,412	0,156	1,026	0,199
FALSE	C (1)	nuc B	UNKN	1,253	1,167	1,345	15,484	15,412	0,156	1,026	0,199
FALSE	C (1)	nuc B	UNKN	1,253	1,167	1,345	15,382	15,412	0,156	1,026	0,199
FALSE	D (1)	nuc B	UNKN	0,749	0,676	0,829	15,506	15,444	0,093	1,037	0,199
FALSE	D (1)	nuc B	UNKN	0,749	0,676	0,829	15,387	15,444	0,093	1,037	0,199
FALSE	E (1)	16S	UNKN				10,690	10,452			0,288
FALSE	E (1)	16S	UNKN				10,309	10,452			0,288
FALSE	E (1)	16S	UNKN				10,357	10,452			0,288
FALSE		nuc B	STAN				15,052				0,199
FALSE		nuc B	STAN				15,046				0,199
FALSE		nuc B	STAN				15,295				0,199
FALSE		nuc B	STAN				16,275				0,199
TRUE	-RT 1201 (2)	nuc B	UNKN								
TRUE	-RT d (2)	nuc B	UNKN								
TRUE	-RT e (2)	nuc B	UNKN								
FALSE	D (1)	nuc B	UNKN	0,749	0,676	0,829	15,439	15,444	0,093	1,037	0,199
FALSE	E (1)	nuc B	UNKN	0,871	0,604	1,257	14,482	14,607	0,108	1,122	0,199
TRUE	E (1)	nuc B	UNKN								
FALSE	E (1)	nuc B	UNKN	0,871	0,604	1,257	14,732	14,607	0,108	1,122	0,199

Rezultati vseh treh ponovitev med različnimi dnevi združeni s programom ViiA 7.0

Biological Replicate Reference Sample Name

Chemistry SYBR® Green Reagents

Created By DEFAULT

Učinkovitost

Description

16S 86,020

Endogenou 16S

nucB 95,040

Instrument ViiA 7

Last Modifi Mon Jun 17 10:33:23 CEST 2013

Number of 3

Quantificati Cr

RQ Confide 95,0

Reaction V20,0

Study Nam Untitled

Study Type RQ

Technical F1201 (1)

Sample Na	Target Nar	Task	Omitted	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct Mean	Normalized Quantity Mean	Normalized Quantity SE
-RT 1201 (:16S			false						
-RT 1201 (:nuc B			mixed						
-RT c (2) 16S			false						
-RT c (2) nuc B			mixed						
-RT d (2) 16S			false						
-RT d (2) nuc B			mixed						
-RT e (2) 16S			false						
-RT e (2) nuc B			mixed						
1201 (1) 16S			false				11,765		
1201 (1) nuc B			false	1,000	2,949	0,339	14,870	0,109	0,612
16S 1201 (:16S			false						
16S 1201 (:nuc B			false						
C (1) 16S			false				11,460		
C (1) nuc B			false	0,836	2,554	0,273	14,687	0,091	0,602
D (1) 16S			false				11,031		
D (1) nuc B			false	0,678	2,047	0,225	14,694	0,074	0,605
E (1) 16S			false				10,164		
E (1) nuc B			mixed	1,078	3,241	0,358	13,040	0,118	0,610

PRILOGA C: Delni izračuni in izpiski programa REST

REST 1201C

24

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB c	TRG	0,9504	0,844	0,773 - 0,922	0,732 - 0,988	0,159	
16S	REF	0,994	1				

Interpretation

nucB c sample group is not different to control group. P(H1)=0,159

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB c	TRG	0,9504	1,091	1,054 - 1,132	1,026 - 1,154	0	UP
16S	REF	0,994	1,294	1,206 - 1,403	1,166 - 1,468	0,037	UP

25

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB C	TRG	0,8217	0,736	0,697 - 0,795	0,652 - 0,814	0,016	DOWN
16S	REF	1	1				

Interpretation

nucB C is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,736 (S.E. range is 0,652 - 0,814). nucB C sample group is different to control group. P(H1)=0,016

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB C	TRG	0,8217	0,949	0,890 - 1,047	0,803 - 1,053	0,517	
16S	REF	1	1,289	1,233 - 1,345	1,210 - 1,377	0,058	

29

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB c	TRG	0,9083	1,271	1,179 - 1,436	1,158 - 1,456	0	UP
16S	REF	0,8317	1				

Interpretation

nucB c is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,271 (S.E. range is 1,179 - 1,436). nucB c sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Effici	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB c	TRG	0,9083	1,4	1,357 - 1,473	1,285 - 1,476	0	UP
16S	REF	0,8317	1,101	1,008 - 1,191	0,989 - 1,208	0,127	

REST 1201 D

24							
Relative Expression Results							
Parameter	Value	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
Iterations	2000						
Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
nucB D	TRG		0,9504	0,543	0,486 - 0,588	0,470 - 0,651	0,08
16S D	REF		0,994	1			

Interpretation
nucB D sample group is not different to control group. P(H1)=0,080

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB D	TRG		0,9504	0,871	0,840 - 0,894	0,830 - 0,909	0,058	
16S D	REF		0,994	1,606	1,439 - 1,790	1,345 - 1,896	0,037	UP

25								
Relative Expression Results								
Parameter	Value	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	
Iterations	2000							
Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB D	TRG		0,8217	0,746	0,701 - 0,785	0,683 - 0,800	0,021	DOWN
16S	REF		1	1				

Interpretation
nucB D is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,746 (S.E. range is 0,683 - 0,800).
nucB D sample group is different to control group. P(H1)=0,021

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB D	TRG		0,8217	1,194	1,093 - 1,287	1,043 - 1,293	0,093	
16S	REF		1	1,6	1,512 - 1,696	1,445 - 1,706	0,077	

29								
Relative Expression Results								
Parameter	Value	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	
Iterations	2000							
Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB d	TRG		0,9083	0,805	0,729 - 0,899	0,710 - 0,951	0	DOWN
16S	REF		0,8317	1				

Interpretation
nucB d is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,805 (S.E. range is 0,710 - 0,951).
nucB d sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB d	TRG		0,9083	1,371	1,317 - 1,447	1,261 - 1,460	0,058	
16S	REF		0,8317	1,702	1,586 - 1,856	1,493 - 1,897	0	UP

REST 1201 E

24							
Relative Expression Results							
Parameter	Value	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
Iterations	2000						
Gene	Type						
nucB e	TRG		0,9504	0,846	0,770 - 0,919	0,732 - 1,000	0,183
16S e	REF		0,994	1			

Interpretation
nucB e sample group is not different to control group. P(H1)=0,183

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB e	TRG		0,9504	2,724	2,602 - 2,885	2,511 - 2,969	0,047	UP
16S e	REF		0,994	3,22	3,021 - 3,520	2,943 - 3,597	0,037	UP

25								
Relative Expression Results								
Parameter	Value	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	
Iterations	2000							
Gene	Type							
nucB E	TRG		0,8217	0,823	0,771 - 0,863	0,756 - 0,879	0	DOWN
16S e	REF		1	1				

Interpretation
nucB E is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,823 (S.E. range is 0,756 - 0,879).
nucB E sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB E	TRG		0,8217	2,837	2,585 - 3,052	2,491 - 3,073	0,093	
16S e	REF		1	3,449	3,312 - 3,586	3,249 - 3,658	0	UP

29								
Relative Expression Results								
Parameter	Value	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	
Iterations	2000							
Gene	Type							
nucB e	TRG		0,9083	0,984	0,810 - 1,163	0,780 - 1,345	0,982	
16S	REF		0,8317	1				

Interpretation
nucB e sample group is not different to control group. P(H1)=0,982

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
nucB e	TRG		0,9083	2,355	2,230 - 2,567	2,095 - 2,621	0	UP
16S	REF		0,8317	2,394	2,142 - 2,721	1,929 - 2,812	0,072	

Rezultati vseh treh ponovitev za vzorec 1201 E med različnimi dnevi združeni s programom REST

združeno z REST							
Relative Expression Results							
Parameter	Value						
Iterations	2000						
Gene	Type	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
nucB skupaj	TRG		0,9167	0,91	0,263 - 3,192	0,184 - 3,949	0,673
16S skupaj	REF		0,9359		1		
Interpretation							
nucB skupaj sample group is not different to control group. P(H1)=0,673							
Non-Normalised Results							
Gene	Type	Reaction	Effic	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
nucB skupaj	TRG		0,9167	2,69	0,593 - 11,545	0,499 - 12,802	0,021 UP
16S skupaj	REF		0,9359	2,956	2,490 - 3,426	1,998 - 3,938	0 UP