



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM EXPRESE GENŮ U BAKTERIE CUPRIAVIDUS
NECATOR A DALŠÍCH VYBRANÝCH PRODUCENTŮ
POLYHYDROXYALKANOÁTŮ**

STUDY ON GENE EXPRESSION IN CUPRIAVIDUS NECATOR AND OTHER SELECTED
POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radmila Centnerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Iva Pernicová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1649/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie

Studentka: **Radmila Centnerová**

Studijní program: Chemie a chemické technologie

Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace

Vedoucí práce: **Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium exprese genů u bakterie *Cupriavidus necator* a dalších vybraných producentů polyhydroxyalkanoátů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Optimalizace RT–qPCR metodiky pro stanovení genové exprese
3. Studium exprese genů zapojených do syntézy PHA a metabolismu 4–hydroxybutyrátu u bakterie *Cupriavidus necator* v závislosti na kultivačních podmínkách

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Radmila Centnerová
studentka

Ing. Iva Pernicová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí
ústavu

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

V Brně dne 1.2.2022

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem exprese genů bakterie *Cupriavidus necator* H16, která je známa jako modelový organismus metabolismu polyhydroxyalkanoátů. V první části této práce byla provedena optimalizace metodiky RT-qPCR, jež byla posléze použita pro studium genové exprese. Dále byly porovnávány různé komerční kity pro izolaci genomické DNA, izolaci RNA, a pro reverzní transkripci a vznik komplementární DNA. Z dostupných kitů byl vybrán ten, se kterým bylo dosaženo nejrelevantnějších výsledků a zároveň byla snadná a bezpečná práce. Při izolaci bylo dosaženo rozdílných výtěžků pro jednotlivé kity, použitý kit má tak velmi významný vliv na kvalitu získané nukleové kyseliny a tím i na úspěšnost celého měření. Izolovaná genomická DNA byla použita pro účely optimalizace a kalibrace. Izolovaná RNA a komplementární DNA byly použity ve druhé části práce, ve které byla studovaná bakterie kultivována na různých uhlíkatých substrátech. Poté bylo pomocí optimalizované RT-qPCR metodiky provedeno studium exprese vybraných genů zapojených do biosyntézy polyhydroxyalkanoátů. Významnější změny v genové expresi byly obecně zaznamenány tehdy, když byla jako uhlíkatý substrát použita fruktóza oproti tomu, když byl použit γ -butyrolakton. Největší nárůst exprese genů byl při kultivaci na fruktóze zaznamenán pro gen, kterým je kódována 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxyláza. Při kultivaci na γ -butyrolaktonu byly významnější změny v expresi pozorovány pouze pro gen kódující 4-hydroxybutyrát dehydrogenázu. Výběr substrátu má tedy zásadní vliv na genovou expresi.

KLÍČOVÁ SLOVA

genová exprese, polyhydroxyalkanoáty, *Cupriavidus necator* H16, PCR, RT-qPCR

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was study on gene expression in bacterium *Cupriavidus necator* H16 that is known as a model bacterium for the metabolism of polyhydroxyalkanoates. In the first part of this thesis, the optimalization of RT-qPCR method was performed. The optimized method was implemented on the study on gene expression. Furthermore, there were tested several commercial isolation kits for the genomic DNA isolation, the RNA isolation and the reverse transcription of the RNA and synthesis of the complementary DNA. These kits were compared in order to choose the one that would have provided the most relevant results and also the kit handling would have been simple and safe. There were different results accomplished for all kits. This means the kit used for the isolation had unneglectable impact on the quality of the isolated nucleic acid and therefore also on the success of the whole measurement. Isolated genomic DNA was used for optimalization and calibration. Isolated RNA and complementary DNA were used in the second part of the thesis. In this part, the studied bacterium was cultivated under various conditions and carbon sources. Subsequently, the optimized RT-qPCR method was performed and used for study on gene expression of chosen genes involved in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates. There were more significant differences in gene expression observed for fructose as a carbon source, compared to γ -butyrolacton as a carbon source. The greatest increase of the gene expression for fructose as a carbon source was measured for gene encoding 4-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. There were more considerable differences in gene expression observed for γ -butyrolacton as a carbon source only for gene encoding 4-hydroxybutyrate dehydrogenase. Therefore, the choice of the carbon source impacts fundamentally the gene expression.

KEY WORDS

gene expression, polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator* H16, PCR, RT-qPCR

CENTNEROVÁ, Radmila. *Studium exprese genů u bakterie Cupriavidus necator a dalších vybraných producentů polyhydroxyalkanoátů* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138824>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Iva Pernicová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Ivě Pernicové, Ph.D., za odborné vedení, veškerou pomoc, cenné rady, vstřícnost a spoustu trpělivosti a času, který mi věnovala. Děkuji také konzultantce Ing. Ivaně Nováčkové za rady při psaní práce. Dále bych ráda chtěla poděkovat prof. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., za vstřícnost a individuální přístup a celé skupině všech studentů v laboratoři za případnou pomoc v laboratoři a trpělivost. Veliké poděkování patří mým přátelům, blízkým a zejména rodině za nekonečnou podporu během celé doby mého studia.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	2
2.1.1	Obecná charakteristika	2
2.1.2	Význam PHA	3
2.2	Metabolismus PHA.....	3
2.2.1	PHA syntázy.....	3
2.2.2	Další enzymy vztahující se k metabolismu PHA a jejich kódující geny.....	5
2.2.3	Syntéza PHA	6
2.2.4	Biodegradace PHA	10
2.3	Bakterie produkující PHA	10
2.3.1	Druhy bakterií produkující PHA	10
2.3.2	Bakterie <i>Cupriavidus necator</i>	11
2.4	Genová exprese a její měření.....	13
3	Experimentální část	14
3.1	Použité chemikálie a přístroje.....	14
3.1.1	Chemikálie použité pro kultivace.....	14
3.1.2	Chemikálie použité pro molekulárně biologická měření	14
3.1.3	Použité primery	15
3.1.4	Použité kity.....	16
3.1.5	Přístroje	16
3.2	Kultivace bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	16
3.2.1	Příprava tekutého kultivačního média.....	16
3.2.2	Příprava produkčního minerálního média pro analýzu genové exprese	17
3.2.3	Stanovení optické hustoty produkčních médií	18
3.2.4	Gravimetrické stanovení biomasy z produkčního média	18
3.3	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie	18
3.4	Izolace bakteriálních nukleových kyselin pro molekulárně biologická stanovení	18
3.4.1	Příprava lysozymu.....	18
3.4.2	Izolace DNA.....	19
3.4.3	Izolace RNA	19
3.4.4	Reverzní transkripce izolované RNA.....	20

3.4.5	Agarózová gelová elektroforéza.....	21
3.5	Optimalizace metody PCR a RT-qPCR.....	22
3.5.1	Příprava primerů.....	22
3.5.2	Optimalizace annealingu pro klasickou PCR.....	22
3.5.3	Optimalizace annealingu pro RT-qPCR.....	24
3.5.4	Analýza RT-qPCR dat pro studium genové exprese.....	24
4	Výsledky a diskuse	26
4.1	Porovnání komerčních kitů na izolace nukleových kyselin bakterií	26
4.1.1	Porovnání komerčních kitů pro izolace bakteriální DNA	26
4.1.2	Porovnání komerčních kitů pro izolace bakteriální RNA	27
4.1.3	Porovnání komerčních kitů pro reverzní transkripci izolované RNA.....	29
4.2	Detekce vybraného úseku <i>phaC</i> genu kódujícího PHA syntázu I. třídy u bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	30
4.2.1	Optimalizace annealingové teploty pomocí gradientové PCR.....	30
4.3	Optimalizace metody RT-qPCR pro studium exprese genů.....	31
4.4	Studium genové exprese bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16 za různých kultivačních podmínek	32
4.4.1	Stanovení optické hustoty	32
4.4.2	Stanovení obsahu a množství PHA pomocí GC-FID.....	34
4.4.3	Izolace RNA pro studium exprese genů.....	37
4.4.4	Získ komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkripce pro analýzu exprese genů	39
4.4.5	Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR.....	40
5	Závěr	48
6	Seznam použitých zdrojů	49
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	55

1 ÚVOD

V současné době stále roste zájem o přírodu a její ochranu a zkrátka o to, jak udělat naši planetu lepším místem pro žití. Jednou z nejvíce skloňovaných činností prospěšných pro ochranu přírody je nahrazování syntetických s přírodou nekompatibilních plastů látkami, které budou k přírodě výrazně šetrnější. Mezi tyto látky se řadí i bioplasty, biokompatibilní polymery. Jejich výroba je biotechnologická a vychází z obnovitelných zdrojů, a zároveň vzniklé biopolymery ale nepostrádají výhodné vlastnosti tradičních syntetických plastů.

Příkladem biopolymerů mohou být i polyhydroxyalkanoáty (PHA), jež svými mechanickými vlastnostmi připomínají např. polypropylen či polyethylen, ale na rozdíl od nich jsou biodegradabilní a biokompatibilní a díky tomu se nemusí řešit problematická otázka s plastovým odpadem. Právě díky těmto vlastnostem a také rozličné struktuře mají PHA velice širokou oblast využití. Jako jedno z hlavních využití se nabízí nejrozumnější obalové materiály, ale využití nachází i ve farmacii a medicíně. Díky své biokompatibilitě nejsou toxické a jejich hydrofobní charakter zaručuje to, že u těchto látek dochází velmi pomalu k biodegradaci. Další významnou vlastností PHA je, že nevykazují karcinogenní účinky, a díky tomu nachází široké použití v kostním, kardiovaskulárním a nervovém tkáňovém inženýrství. V těchto medicínských oblastech jsou poté využity jako materiály pro nejrozumnější scaffoldy, srdeční chlopně nebo implantáty s dlouhodobým uvolňováním léčiv, případně také jako nosiče léčiv.

PHA fungují jako zásobní zdroj uhlíku řady organismů, nejčastěji však bakterií, které pak produkují tyto polyester v různých množstvích. Nicméně ani stresové podmínky nevedou ke zvýšení produkce PHA, pokud bakterie nesplňují jeden zásadní předpoklad k tomu, aby se dalo o nějaké produkci PHA uvažovat. Bakterie musí v sobě nést geny, které kódují enzymy, jež umožňují průběh biosyntézy PHA. Proto je důležité pomocí vhodné metody analyzovat genovou expresi právě těchto genů, bez kterých by produkce PHA nebyla možná. Z těchto důvodů se tato práce věnuje studiu genové exprese klíčových genů vybraného producenta PHA, kterým je bakterie *Cupriavidus necator* H16.

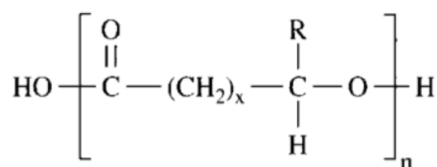
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

2.1.1 Obecná charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří mezi velmi rozšířené skupiny polyesterů. Jsou syntetizovány mnoha druhy bakterií, kterým slouží jako intracelulární zdroj uhlíku a energie. Mezi jedinečné vlastnosti těchto sloučenin patří biodegradabilita a biokompatibilita [1, 2]. Typem sloučeniny, jež tvoří PHA, jsou různé typy esterů 3-hydroxy organických kyselin [3]. Ty, které vyprodukují bakterie, vynikají kompletní stereospecifitou, což znamená, že mají na všech chirálních atomech uhlíku v hlavním řetězci *R*(-) konfiguraci. Právě díky této unikátní vlastnosti je zajištěna jejich biokompatibilita a biodegradabilita [4].

Struktura polyhydroxyalkanoátu je zobrazena na obrázku 1. Písmenem *n* je označován stupeň polymerace a písmenem *R* postranní řetězec polyhydroxyalkanoátu.



Obrázek 1: Obecná struktura polyhydroxyalkanoátu [5]

V bakteriích se PHA nachází ve formě granulí [1], které se vyskytují v cytoplazmě [6]. Díky akumulaci ve formě granulí jsou bezpečně odděleny od dalších částí buňky a je tak zabráněno změnám osmotického tlaku v buňce [7].

Strukturu a molární hmotnost PHA ovlivňuje typ bakterie, jež je vyprodukovala, a také podmínky, ve kterých je bakterie podrobena růstu. Molekulová hmotnost PHA je uváděna mezi $2 \cdot 10^5$ a $3 \cdot 10^6$ Da [4]. Podle délky řetězce nebo také podle počtu atomů uhlíku v řetězci, se PHA rozděluje do několika skupin. První skupinou jsou PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA), které mají tři až pět atomů uhlíku v řetězci, dále PHA se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA) se šesti až čtrnácti atomy uhlíku, a PHA s dlouhým řetězcem (lcl-PHA) mající více než čtrnáct atomů uhlíku [1, 4, 8]. Dále se rozděluje podle monomerů, z kterých jsou složeny, na homopolymery (obsahují pouze jeden monomer), heteropolymery (náhodně se střídají nejméně dva různé monomery) a blokové kopolymery (tvořeny dvěma odlišnými homopolymery, jež jsou kovalentně propojeny) [1]. Řetězce monomerů tvořící PHA mohou být lineární, rozvětvené, nasycené, nenasycené nebo aromatické. Taktéž se na nich vyskytují funkční skupiny, které umožňují chemické modifikace těchto sloučenin. Mezi tyto skupiny se řadí např. skupina methylesterová, karboxylová, hydroxylová, epoxylová, fenoxyllová nebo všechny halogeny [1, 4].

2.1.2 Význam PHA

Díky přítomnosti granulí PHA v cytoplazmě je bakterie více rezistentní vůči nepříznivým teplotám, změnám pH nebo osmotického tlaku. Také slouží jako rezervoár uhlíku a energie pro buňku [1].

Většina PHA produkujících bakterií začne PHA produkovat tehdy, kdy jsou vystaveny stresu, který se projevuje nedostatkem nezbytných živin [4, 9–12]. Stres je vyvolán vážným nedostatkem esenciálních živin, mezi které se řadí dusík, fosfor či kyslík, a velkým přebytkem zdroje uhlíku [2, 4]. Ke zvýšené akumulaci dochází i v případě nedostatku dusíku, ale současně uhlík musí být v nadbytku, aby docházelo k akumulaci PHA [4]. Některé bakterie zahajují produkci PHA jako reakci na nepříznivé podmínky prostředí, například zvýšenou salinitu [6].

Díky svým biodegradabilním a biokompatibilním vlastnostem mají PHA využití jako náhrada běžných plastů na ropné bázi a mohly by tak přispět k řešení potíží spojených s plastovým znečištěním a environmentálními problémy. Kromě biodegradability a biokompatibility vykazují v závislosti na monomerním složení i elastomerní a termoplastické vlastnosti [1, 7], díky čemuž by mohly být využity ve farmacii nebo jako obaly v potravinářství. Zatím je ale jejich produkce v porovnání s běžnými plasty nízká a zejména drahá [1, 6].

2.2 Metabolismus PHA

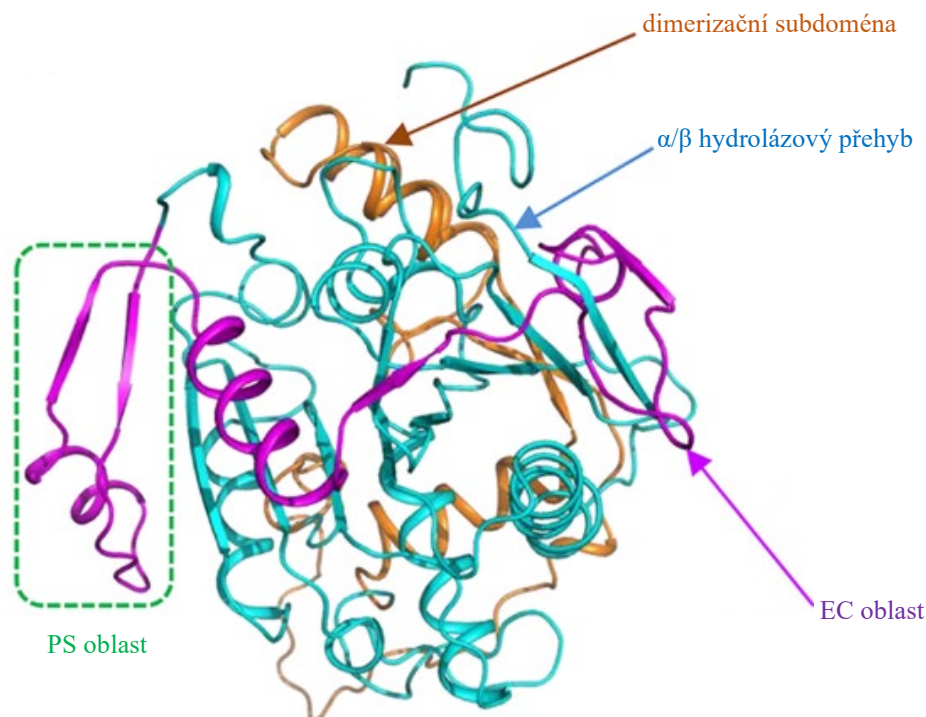
K produkci PHA dochází v aerobních i anaerobních podmínkách [4]. Jednotlivé molekuly mastných kyselin jsou v PHA vzájemně propojeny esterovou vazbou, která se vyskytuje mezi hydroxylovou skupinou jedné molekuly a karboxylovou skupinou druhé molekuly [7].

2.2.1 PHA syntázy

Průběh biosyntézy PHA by nebyl vůbec možný bez přítomnosti enzymů PHA syntáz (PhaC), které umožní polykondenzaci monomerů hydroxyalkanoátů do výsledného polymeru, a které katalyzují polymerizaci hydroxyacyl-koenzymu A na PHA a volný koenzym-A [8].

PHA syntázy mohou být tvořeny jednou, ale i více podjednotkami [13–15]. Podle substrátové specifity a složení jednotlivých podjednotek tvořících enzym se PHA syntázy rozdělují do čtyř tříd – PHA syntázy I. třídy, II. třídy, III. třídy a IV. třídy [8, 14–17].

PHA syntázy I. třídy jsou tvořeny pouze jednou podjednotkou, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje mezi 60–73 kDa. Vyšší katalytickou aktivitu vykazuje tato třída PHA syntáz v dimerní formě. PHA syntáza I. třídy je kódována genem *phaC* a výsledkem biosyntézy je biopolymer scl-PHA, nejčastěji poly-3-hydroxybutát P(3HB). PHA syntáza této třídy je známá např. u bakterie *Cupriavidus necator* [8, 14–16, 18]. Podrobně strukturu PHA syntázy I. třídy zobrazuje obrázek 2.



Obrázek 2: Monomerní struktura PHA syntázy I. třídy bakterie *Cupriavidus necator* H16; PS oblast = vyčnívající strukturní oblast, EC oblast = rozšířená C-terminální oblast; upraveno z [19]

PHA syntázy II. třídy jsou rovněž tvořeny pouze jednou podjednotkou o molekulové hmotnosti 60–65 kDa. Za jejich přítomnosti probíhá syntéza mcl-PHA. Těmito třídami PHA syntáz vynikají především bakterie rodu *Pseudomonas* [8, 14, 15]. Jelikož PHA syntázy II. třídy katalyzují syntézu mcl-PHA, jsou jejich cílovým monomerem hydroxyalkanoáty o šesti a více atomech uhlíku [16, 17, 20].

PHA syntázy III. jsou tvořeny dvěma podjednotkami. Skládají se z podjednotky PhaC (velikost této podjednotky je 40–53 kDa) a PhaE (20–40 kDa). Kvůli podjednotce PhaE jsou syntázy III. třídy rozdělovány na bakteriální a archeální typ. PHA syntázy III. třídy mají např. halofilní bakterie *Allochromatium vinosum* [21, 22].

PHA syntázy IV. třídy jsou tvořeny taktéž dvěma podjednotkami. Jedná se konkrétně o podjednotky PhaC a PhaR kódované geny *phaC* a *phaR*. U této třídy syntáz je přítomnost PhaR signifikantní pro úplnou expresi PhaC. PHA syntázy IV. třídy byly pozorovány u bakterií kmene *Bacillus* [8, 14, 15]. Podle sekvence PhaC se třída rozděluje na dvě nejdůležitější skupiny a hlavními zástupci jsou bakterie *Bacillus megaterium* a *Bacillus cereus*. PhaC je přibližně dvakrát (molární hmotnost se pohybuje okolo 40 kDa) větší než podjednotka PhaR (kolem 20 kDa). *Bacillus cereus* má rozsáhlejší substrátovou specifitu a obě skupiny mají rovněž odlišnou organizaci a kompozici lokusu genů, které jsou zodpovědné za biosyntézu PHA [14].

PHA syntázy III. a IV. třídy katalyzují, stejně jako PHA syntázy I. třídy, produkci scl-PHA [8, 14, 15]. PHA syntázy IV. třídy zároveň vynikají tím, že kromě polymerizace PHA jsou schopny katalyzovat i alkoholické štěpení PHA řetězců. Toto štěpení nastává tehdy, kdy je přítomna pouze molekula alkoholu, ale chybí monomer hydroxyacyl-koenzymu A [14]. Jako

substráty pro produkci scl-PHA u I., III. a IV. třídy slouží prekurzory o šesti a méně uhlíkových atomech, jako je např. propionát, butyrát, valerát a hexanoát [16].

2.2.2 Další enzymy vztahující se k metabolismu PHA a jejich kódující geny

Kromě PHA syntáz je k metabolismu PHA zapotřebí zapojení celé řady dalších enzymů, a každý enzym katalyzující dílčí kroky metabolismu PHA je kódován specifickým genem. Geny se označují zkratkou *pha*, a ty, jež se podílí na syntéze, se značí v abecedním pořadí (např. *phaA*, *phaB*, *phaC*), a ty, které se podílí na degradaci, se značí písmeny od konce abecedy (např. *phaZ*) [14, 16, 23].

Přehled enzymů a k nim příslušejících genů je zobrazen v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled enzymů a genů podílejících se na metabolismu PHA [1, 14–17, 21–23]

Název genu	Kódovaný enzym	Funkce enzymu
<i>phaA</i>	β -ketothioláza	kondenzace acetyl-CoA, současně vznik acetoacetyl-CoA
<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reduktáza	redukce acetoacetyl-CoA na (<i>R</i>)-3-hydroxybutyryl-CoA
<i>phaC</i>	PHA syntáza	polymerizace hydroxyalkanoátů na PHA
<i>phaG</i>	(<i>R</i>)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza	transformace 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA
<i>phaJ</i>	enoyl-CoA hydratáza	transformace enoyl-CoA na (<i>R</i>)-3-hydroxyacyl-CoA
<i>phaM</i>	aktivátor a urychlovač katalytické aktivity	aktivátor, urychlovač katalytické aktivity
<i>phaP</i>	phasiny	proteiny sestavující granule
<i>phaZ</i>	PHA depolymeráza	depolymerizační enzym

Z výše uvedených genů je gen *phaB* závislý na NADPH a hraje důležitou roli v dodávání monomeru (*R*)-3HB-CoA pro samotnou polymerizaci PHA. Phasiny, kódovaný genem *phaP*, jsou proteiny neenzymatické, vyskytují se na povrchu PHA granulí v buňce a jeho úkolem je blokování navázání zbytečných proteinů. Kromě výše uvedených nejdůležitějších

genů a enzymů se podílí ještě geny *phaR*, které u PHA syntáz IV. třídy kódují společně s *phaC* podjednotky PHA syntázy, zároveň může plnit i funkci regulačního proteinu. Další z genů označovaný jako *phaQ* kóduje transkripční regulátor ovlivňující expresi phasinů [14, 16, 23].

2.2.3 Syntéza PHA

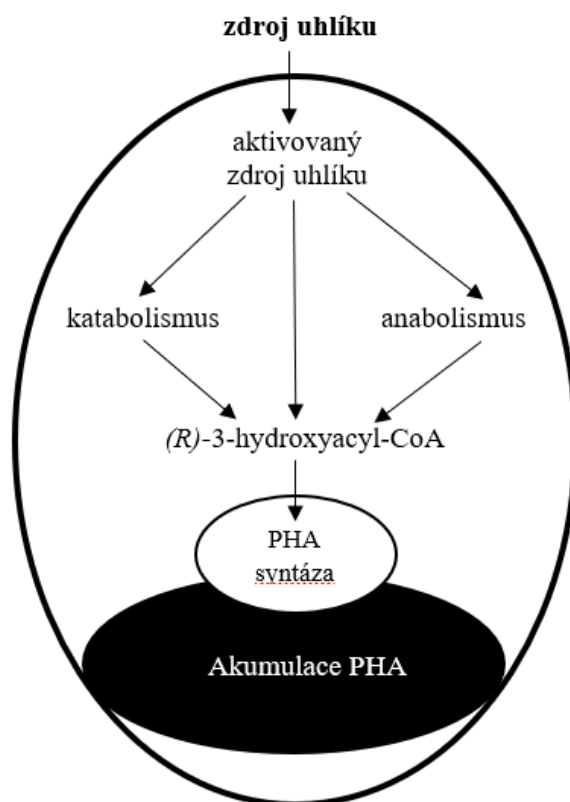
Syntéza PHA je reakce sestávající z několika kroků a je pro ni k dispozici několik biosyntetických drah. Do dnešní doby bylo zaznamenáno osm drah, nicméně dobře popsány jsou pouze tři z nich. Tyto tři dráhy závisí na zdroji uhlíku použitým při biosyntéze [15, 24, 25].

Biosyntetická dráha rovněž ovlivňuje strukturu výsledného polymeru, nicméně součástí jakékoli z těchto drah musí být strukturní reakce tvořena polymerizací, kterou katalyzuje výše zmíněný enzym PHA syntáza [15, 24, 25].

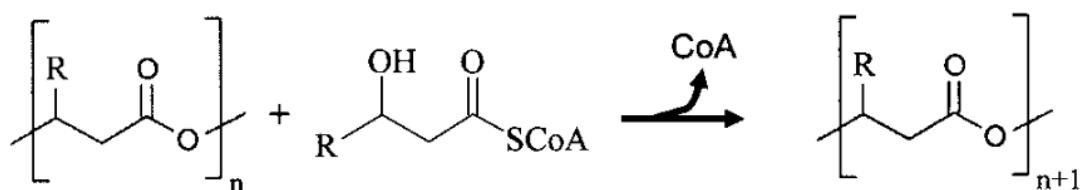
PHA mohou být produkovány ze substrátů, jež jsou výslednému PHA strukturně podobné, anebo naopak ze substrátů odlišných. Příkladem strukturně podobného substrátu mohou být mastné kyseliny, strukturně odlišným substrátem je např. glukóza [1, 15].

Dále je možné připravit i kopolymery PHA, a to za použití jistých substrátů, které umožňují vznik kopolymerů, nebo za použití směsi substrátů. Vznik kopolymerů lze také podpořit použitím prekurzorů [14]. Klíčovou molekulou pro syntézu PHA je acetyl-CoA [1].

Průběh biosyntetické dráhy PHA je znázorněn na obrázku 3 a obrázku 4.



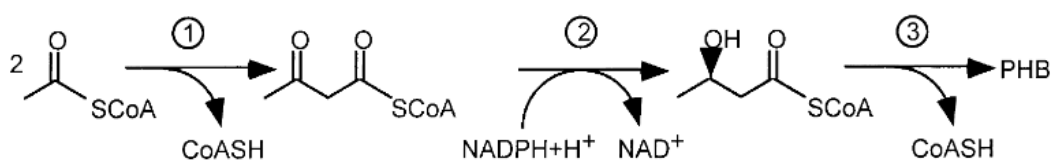
Obrázek 3: Obecné schéma biosyntézy PHA, upraveno z [13]



Obrázek 4: Obecné reakční schéma biosyntézy PHA [26]

Nejběžnější biosyntetickou dráhou je dráha syntézy P(3HB), který je rovněž nejběžnějším a nejvíce studovaným PHA. Jeho syntéza je tříkroková reakce a každý krok je katalyzován různým enzymem [1, 27, 28]. Tyto enzymy, nutné pro biosyntézu P(3HB), jsou β -ketothioláza, acetoacetyl-CoA reduktáza a PHA syntáza [1, 2, 24]. Geny *phaA*, *phaB* a *phaC*, jež kódují tyto enzymy, jsou uspořádány v operonu *phbCAB*. V této dráze vznikají scl-PHA. Syntéza je zahájena reverzibilní kondenzací dvou molekul acetyl-CoA a reakce je umožněna díky katalýze enzymem β -ketothiolázou (PhaA). Výsledkem této reakce je acetoacetyl-CoA. Ten je redukován acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) závislou na NADPH na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Z tohoto meziproductu jsou poté vytvářeny monomery 3-hydroxybutyrátu (3HB) a za přítomnosti PHA syntázy (PhaC) vzniká P(3HB). Pro syntézu PHA je signifikantní vysoká koncentrace acetyl-CoA, jelikož acetyl-CoA vytvořený metabolizací substrátu uhlíku je rovněž metabolizován v TCA cyklu (Krebsův cyklus) [1, 27, 28]. Tento způsob syntézy P(3HB) je typický pro bakterii *Cupriavidus necator*, který je označován za modelového producenta PHA a známá schopnostmi syntetizovat scl-PHA [27, 28].

Schéma biosyntézy P(3HB) je zobrazeno na obrázku 5.



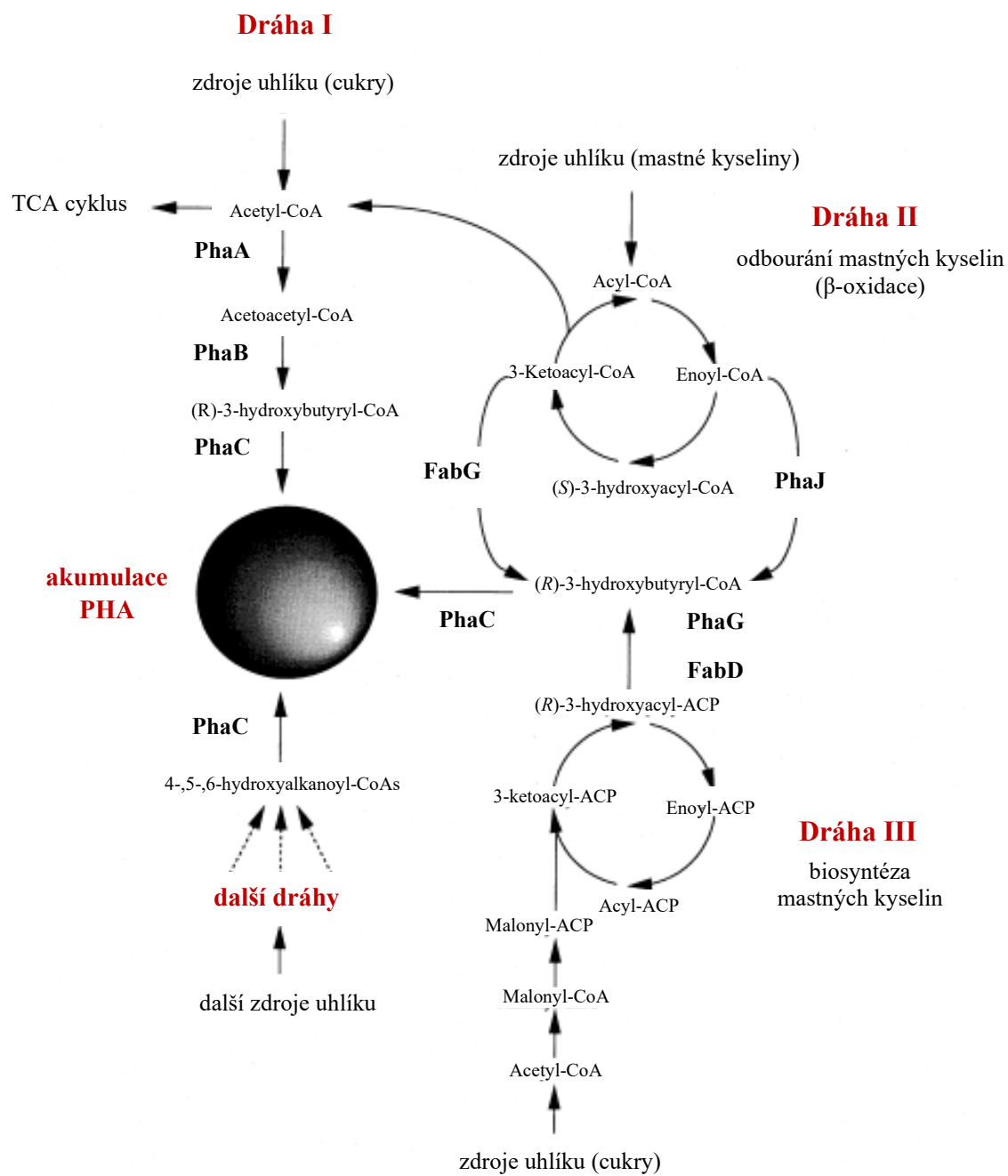
Obrázek 5: Reakční schéma biosyntézy P(3HB); 1 – β -ketothioláza, 2 – acetoacetyl-CoA reduktáza, 3 – PHA syntáza, enzymy vyžadované pro daný krok biosyntézy [7]

Monomery mcl-PHA jsou polymerizovány ve druhé biosyntetické dráze, v níž jsou metabolizovány mastné kyseliny. Součástí této dráhy je β -oxidace mastných kyselin, které jsou přetransformovány na thioestery acyl-CoA. Tyto meziproducty jsou poté oxidovány na trans-enoyl-CoA a (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA na 3-ketoacyl-CoA. Ten je poté v přítomnosti β -ketothiolázy rozštěpen na acetyl-CoA a acyl-CoA, který má o dva uhlíkové atomy kratší řetězec než původní acyl, a tyto dva uhlíkové atomy jsou právě v současně vzniklém acetyl-CoA. Trans-enoyl-CoA o cíleném počtu atomů uhlíku a v (*S*)-konfiguraci, což je nepolymerizovaná forma, je převeden na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, a probíhá v přítomnosti enzymu enoyl-CoA-hydratáza (PhaJ). (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA je ideálním prekurzorem pro další krok, což je polymerace mcl-PHA za katalýzy PHA syntázou. (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA lze získat také za pomoci nespecifického enzymu 3-ketoacyl-ACP-reduktázy, která je součástí syntézy mastných kyselin *de novo*. Druhá biosyntetická dráha je známá např. pro bakterie rodu *Pseudomonas* [1,17, 27].

(*R*)-3-hydroxyacyl-ACP získaný z biosyntézy mastných kyselin *de novo* je využíván ve třetí biosyntetické dráze PHA. Ten je převáděn na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA pomocí enzymu označovaném jako (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza. Poté dochází k polymerizování příslušných monomerů pomocí PHA syntázy na PHA. Do této biosyntetické dráhy je zapojena i β -oxidace mastných kyselin, jelikož je z ní získán substrát acyl-ACP, který je substrátem pro enzym 3-ketoacyl-ACP reduktázu, a tento enzym je také součástí třetí biosyntetické dráhy. V této dráze je umožněno využití levných a strukturně nepříbuzných zdrojů uhlíku. Výsledný syntetizovaný biopolymer pak závisí na použitém zdroji uhlíku [17, 27].

V okamžiku, kdy jsou PHA syntetizovány uvnitř buněk v cytoplazmě, agregují do tvaru granulí. Agregace je způsobena hydrofobními interakcemi. Povrch agregovaných granulí je tvořen mj. navázanými enzymy, které mají podíl na syntéze, regulaci a degradaci naakumulovaných PHA [8].

Dráhy zapojené do biosyntézy PHA jsou zobrazeny na obrázku 6.



Obrázek 6: Dráhy zapojené do biosyntézy PHA, upraveno z [13]

2.2.4 Biodegradace PHA

Existují dva typy biodegradace PHA, intracelulární a extracelulární. Intracelulární degradace představuje aktivní degradaci endogenních zásob PHA, které jsou naakumulované v bakteriích. Na tomto typu degradace se podílí intracelulární PHA depolymerázy (i-PHA depolymerázy). Extracelulární degradace pak představuje využití exogenního polymeru, jež vylučuje extracelulární PHA depolymeráza (e-PHA depolymeráza) [29].

Intracelulární PHA jsou nazývány jako nativní granule PHA, jsou v amorfním stavu a mobilní. Granule mají na povrchu vrstvičku z proteinů citlivou na namáhání, ať už chemické nebo fyzikální. Extracelulární PHA se z naakumulovaných buněk uvolňuje až po smrti buněk nebo po jejich lýze. Molekuly extracelulárních PHA mají částečně krystalickou formu – stupeň krystalinity je 50–60 % [29].

Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že biodegradace probíhá na povrchu granulí díky enzymatické hydrolýze. Kromě toho má ale na biodegradaci vliv celá řada dalších faktorů, jako je např. struktura a kompozice monomeru, ze kterých vznikl polymer, molekulová hmotnost, nebo stupeň krystalizace. Odbourání PHA probíhá kompletně ve vodném prostředí za aerobních podmínek, při čemž vznikají oligomery hydroxykyselin. Ty jsou po skončení biodegradace metabolizovány dalšími mikroorganismy [13].

Obecně P(3HB) je velmi pevný biopolymer nerozpustný ve vodě [13, 15] o vysoké molekulové hmotnosti, a kvůli tomu není schopen se dostat přes buněčnou stěnu. Z tohoto důvodu mikroorganismy vylučují extracelulární P(3HB) depolymerázy, a ty hydrolyzují pevný P(3HB) na monomery nebo oligomery, které už jsou rozpustné ve vodě. Enzymatická degradace P(3HB) materiálů pomocí P(3HB) depolymerázy je heterogenní reakce, kterou tvoří dva kroky, adsorpce a hydrolýza. Adsorpce enzymu na povrchu P(3HB) materiálu je první krok a je umožněna díky vazebné straně enzymu. Na průběhu tohoto reakčního kroku se podílí i struktura polymeru v pevném stavu, jelikož ta právě ovlivňuje adsorpci P(3HB) depolymerázy. Při nízkých koncentracích P(3HB) depolymerázy je většina katalyticky aktivních stran adsorbovaných enzymů schopna hydrolyzovat řetězce P(3HB) na povrchu. Naopak při vysokých koncentracích enzymu nemá většina katalyticky aktivních stran přístup k P(3HB) řetězci na povrchu, a to v důsledku přeplnění stran, které vážou substrát na povrchu P(3HB). Enzymatická hydrolýza polymerních řetězců aktivní stranou enzymu je druhým krokem biodegradace. V tomto kroku vzniká převážně 3HB dimer a v malém množství i 3HB monomer, které jsou rozpustné ve vodě. Nicméně P(3HB) depolymeráza vždy hydrolyzuje pouze esterovou vazbu mezi následujícími (*R*)-3HB jednotkami a několik studií dokonce odhalilo stereoselektivitu P(3HB) depolymerázy, která hydrolyzuje poly-(3-hydroxybutyrát) [13].

2.3 Bakterie produkující PHA

2.3.1 Druhy bakterií produkující PHA

Produkce PHA jsou schopny bakterie grampozitivní i gramnegativní [4, 16]. Mezi dobře prozkoumané druhy bakterií produkující PHA patří mezofilní bakterie, mezi které se řadí např.

Burkholderia sacchari. Produkce PHA byla pozorována i u bakterií termofilních, například *Chelatococcus themostellatus*, *Schlegelella thermodepolymerans* či *Aneurinibacillus sp. H1*. Další skupinou bakterií schopných produkce PHA jsou halofilní bakterie, jež jsou velmi dobrými producenty. Pro tuto skupinu PHA produkujících bakterií je tvorba PHA jednou ze strategií adaptace na podmínky a prostředí o vysoké salinitě. Příkladem halofilní bakterie je *Halomonas halophila*. Další skupinou bakterií schopných produkce PHA jsou bakterie extrémofilní [6].

Dalšími bakteriemi, které jsou schopny produkce PHA, jsou *Bacillus megaterium*, u které byla poprvé pozorována produkce PHA, specificky poly(3-hydroxybutyrátu) P(3HB). Z rodu *Bacillus* produkují PHA i *Bacillus subtilis* nebo *Bacillus cereus*. Z rodu *Pseudomonas* jsou to pak bakterie *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*. Dále PHA produkují např. bakterie *Azotobacter vinelandii*, *Streptomyces lividans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Cupriavidus necator* (dříve označována jako *Ralstonia eutropha*) nebo *Escherichia coli*, která ale produkuje PHA pouze jako geneticky modifikovaný organismus (GMO) [7, 15].

K zahájení syntézy PHA je vyžadován nadbytek zdroje uhlíku. Zdroje uhlíku jsou velmi rozmanité, materiálem pro tyto účely mohou být např. různé sacharidy, od monosacharidů až po polysacharidy (např. lignocelulóza), mastné kyseliny nebo aminokyseliny [1, 4, 6, 7]. Materiálem použitým na produkci PHA mohou být i různé druhy odpadu, např. odpadní otruby, mláto, vinné matoliny, u některých bakterií také kávová sedlina či dřevěné piliny [30–33].

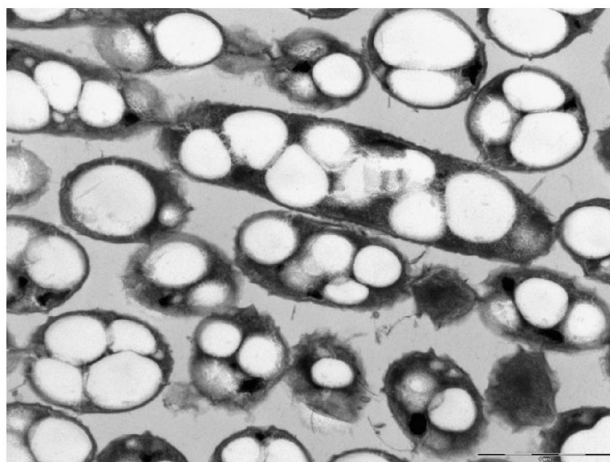
2.3.2 Bakterie *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator patří mezi gramnegativní bakterie. Zároveň bývá řazena i mezi bakterie chemolitoautotrofní [17]. Její velikou předností je, že zvládá akumulovat velké množství PHA. Většina bakterií, které PHA akumulují, dovedou akumulovat pouze přibližně takové množství PHA, které by odpovídalo 30–50 % suché hmotnosti buněk, nicméně bakterie *Cupriavidus necator* dokáže akumulovat tolik PHA, které odpovídá až 90 % suché hmotnosti [14].

Bakterie disponuje PHA syntázou I. třídy, PHA syntáza je tedy tvořena pouze jediným proteinem PhaC ve formě aktivního dimerního enzymu [16]. Řadí se mezi bakterie, které jsou schopny akumulovat scl-PHA [15], zejména pak poly-(3-hydroxybutyrát) P(3HB) [16]. *Cupriavidus necator* je zároveň velmi výhodnou bakterií co se týče kultivačních podmínek. Dobře totiž roste už při kultivaci při teplotě 30 °C, na rozličných zdrojích uhlíku, např. na mastných kyselinách nebo aminokyselinách. Jako zdroj uhlíku nemůže být ale použita glukóza, jelikož ji tato bakterie neumí využít jako uhlíkový substrát [24].

Bakterie má také vysoký potenciál produkovat velká množství kopolymerů. Při prvních pokusech o produkci kopolymerů pomocí této bakterie byl k P(3HB) přidán ještě 3-hydroxyvalerát (3HV). Výsledným produktem biosyntézy byl poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) P(3HB-co-3HV). Procentuální zastoupení 3HV ve vzniklém kopolymeru se pohybuje mezi 0 až 45 hm. % [24].

Granule P(3HB) vyprodukované bakterií *Cupriavidus necator* H16 zobrazuje obrázek 7.



Obrázek 7: Granule P(3HB) v bakterii *Cupriavidus necator* H16 [34]

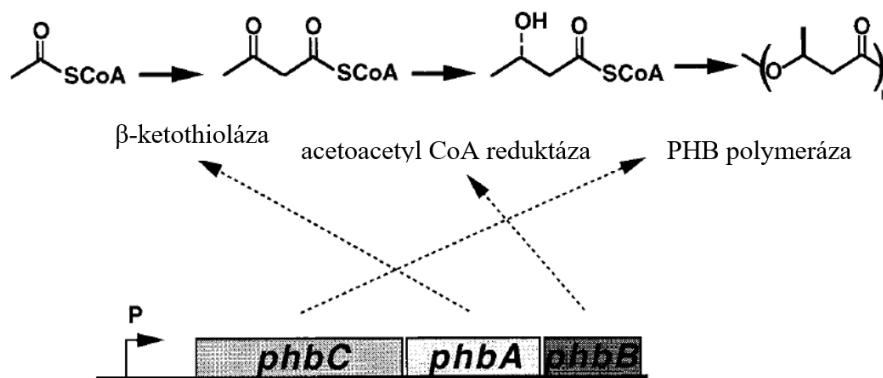
Metabolismus PHA modelové bakterie Cupriavidus necator H16

Cupriavidus necator H16 má několik signifikantních enzymů, o kterých je známo, že jsou zapojeny do produkce P(3HB), které se souhrnně označují jako GAP (proteiny asociované s granulemi PHA). Patří sem celkem dvě 3HB-oligomerní hydrolázy (PhaY1 a PhaY2) a sedm P(3HB) depolymeráz (PhaZ1 až PhaZ7). PhaZ2 až PhaZ5 jsou homology PhaZ1 a podobají se PhaZ1 v sekvenci aminokyselin a v reziduích aktivních zbytků. PhaZ6 a PhaZ7 pak reprezentují odlišný typ P(3HB) depolymeráz s velmi vysokou aktivitou. Dále sem patří ještě sedm phasinů, regulační proteiny označované také jako regulátory transkripce a další proteiny, jejichž funkce ještě nebyla objasněna. Kromě výše zmíněných se sem řadí ještě dva proteiny, které se vážou přímo na P(3HB) a nukleoid bakterie [35–39]. Stěžejními enzymy pro metabolismus P(3HB) jsou u bakterie *Cupriavidus necator* H16 PHA syntáza PhaC (PhaC1) a P(3HB) depolymeráza PhaZ (PhaZa1), jež degraduje polymer P(3HB) [37].

Pro syntézu P(3HB) jsou geny kódující příslušné enzymy uspořádány do operonu *phbCAB*. Gen *phbA* kóduje β -ketothiolázu, v jejímž aktivním místě je molekula cysteinu. Díky této molekule dojde k deprotonaci acetyl-CoA a ten kondenzuje s druhou vázanou molekulou acetyl-CoA a vzniká acetoacetyl-CoA. Díky dvěma typům ketothiolázy lišící se substrátovou specifitou může syntézou vznikat homopolymer P(3HB), homopolymer P(3HV) anebo kopolymer sestavený z monomerů 3HB a 3HV. První ketothioláza je přímo součástí operonu, je kódována genem *phbA* a produktem kondenzace je acetoacetyl-CoA, který je později metabolizován na monomery 3HB. Druhá ketothioláza je kódovaná genem *bktB*, ten ale není v operonu *phbCAB*, ale v genovém clusteru bakterie. Tato ketothioláza katalyzuje kondenzaci acetyl-CoA s propionyl-CoA, který byl získán z metabolismu adekvátního substrátu za vzniku 3-ketovaleryl-CoA. Stejně jako acetoacetyl-CoA je i tento produkt redukován a polymerizován a výsledný polymer obsahuje monomery 3HV. Další enzym, acetoacetyl-CoA reduktáza, je kódován genem *phbB*, a katalyzuje přeměnu acetoacetyl-CoA na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA, aktivitu podmiňují redukční ekvivalenty NADPH. Poslední nezbytný enzym PHA syntáza je kódován genem *phbC*. Je naprosto nepostradatelný, jelikož katalyzuje polymeraci monomerů (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA na samotný P(3HB) díky vytváření esterových vazeb. PHA syntáza bakterie *Cupriavidus necator* H16 potřebuje pro svou správnou funkci protein PhaM, který plní roli aktivátoru, jelikož zvýší katalytickou aktivitu syntázy. Rostoucí řetězec polymeru

se k syntáze váže kovalentně a postupně tímto způsobem vznikají granule, jež jsou nerozpustné ve vodě [16, 17, 24].

Operon, a s ním jednotlivé enzymy, bakterie *Cupriavidus necator* H16 je zobrazen na obrázku 8.



Obrázek 8: Operon *phbCAB* a geny kódující jednotlivé enzymy pro biosyntézu P(3HB), upraveno z [17]

2.4 Genová exprese a její měření

Genová exprese je proces, při kterém dochází ke konverzi genetické informace z DNA do RNA a odtud posléze do proteinu. Přepis části molekuly DNA do RNA je označován jako transkripce, následný překlad pořadí nukleotidů v RNA do pořadí aminokyselin v proteinu je nazýván jako translace. Genetickou informaci pak není možné zpětně přepsat z proteinu do DNA, nicméně lze přepsat informaci z RNA do DNA. Tento děj se označuje jako reverzní transkripce. Toto všechno vychází z centrálního dogmatu molekulární biologie, jež pojednává o přenosu informací mezi nukleovými kyselinami a proteiny. Hlavní kontrola genové exprese probíhá na úrovni transkripce [40, 41].

Základní strukturní jednotkou genetické informace jsou geny. Geny kódující funkční složky buněk se rozdělují na dvě skupiny. Prvním typem jsou geny strukturní, jež nesou informaci o primární struktuře proteinu. Druhou skupinou jsou geny pro funkční RNA, u kterých produkty transkripce nepodléhají translačnímu procesu. Genetický kód je vždy čten po třech nukleotidech [40, 41].

Pro úspěšné studium exprese genů u PHA produkujících bakterií jsou vybírány geny zapojené do metabolismu PHA a dále geny označované jako housekeeping, které vykazují stále stejnou expresi, nehlédě na konkrétní podmínky. Díky své konstantní expresi se housekeeping geny používají pro porovnání a stanovení variability exprese daného studovaného genu. Poté je díky tomuto stanovení možné nastavit ideální podmínky pro nejvyšší produkci PHA [42]. Geny, jež kódují enzymy nezbytné pro biosyntézu PHA, zejména zcela nepostradatelné PHA syntázy, je možné stanovit pomocí různých molekulárních technik. Identifikace PHA genů je umožněna např. metodou Southern blotting nebo pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), a to amplifikací za použití vhodných specifických primerů. Kvantifikace exprese genů podílejících se na biosyntéze PHA se provádí za použití kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) [43, 44].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Chemikálie použité pro kultivace

- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- D-fruktóza, p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- glycerol, bezvodý (Lach-Ner, Česká republika)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid chromnatý (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid kobaltnatý hexahydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid nikelnatý hexahydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid vápenatý dihydrát, p.a. (Lachema, Česká republika)
- chlorid železitý (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Nutrient broth (HiMedia, Indie)
- síran amonný, p.a. (LachNer, Česká republika)
- síran hořečnatý heptahydrát, p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- síran měďnatý pentahydrát (Lachema, Česká republika)

3.1.2 Chemikálie použité pro molekulárně biologická měření

- β -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- agaróza (Sigma-Aldrich, Německo)
- dekontaminační roztok RNaseZap (Sigma-Aldrich, Německo)
- DNA ladder 1 kb Plus o velikosti fragmentů 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp (Nippon Genetics Europe, Německo)
- DNA ladder 100 bp o velikosti fragmentů 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Nippon Genetics Europe, Německo)
- ethanol 99,8% (Lach-ner, ČR)
- ethylendiamintetraacetát sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina boritá (Lachema, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina benzoová (LachNer, Česká republika)
- kyselina sírová (LachNer, Česká republika)
- methanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- chloroform (LachNer, Česká republika)
- isopropanol (LachNer, Česká republika)
- hydroxid sodný p.a. (LachNer, Česká republika)
- lysozym (Serva, Německo)
- Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrům (New England BioLabs, Velká Británie) o složení:
 - 20 mM Tris-HCl

- 22 mM KCl
- 22 mM NH₄Cl
- 1,8 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs
- 5% glycerol
- 0,06% IGEPAL CA-630
- 0,05% Tween 20
- 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza
- Master Mix qPCR (2x koncentrovaný) SYTO-9 (Top-Bio, Česká republika) o složení:
 - 150mM Tris-HCl
 - pH 8,8 (25 °C)
 - 40mM (NH₄)₂SO₄
 - 5mM MgCl₂
 - 400μM dATP
 - 400μM dCTP
 - 400μM dGTP
 - 400μM dTTP,
 - Taq DNA polymeráza (50 U/ml)
 - monoklonální protilátka anti-Taq
 - SYTO-9
 - stabilizátory a aditiva.
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Německo)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)
- PCR vkladací pufr Yellow load (Top-Bio, Česká republika)
- sterilní voda Aqua pro injectione (B. Braun Medical, Německo)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-Ner, Česká republika)

3.1.3 Použité primery

- všechny použité primery (uvedené v tabulce 2) byly od firmy Generi Biotech, Česká republika

Tabulka 2: Seznam použitých primerů a jejich sekvence

Kódovaný produkt	Primery	Sekvence primerů	Předpokládaná t_A [°C]
16S rRNA	q16S-F	CGGAATTACTGGGCGTAAAG	51
	q16S-R	ACGCATTTCACTGCTACACG	
4-hydroxybutyrát dehydrogenáza	4HBD-F	TGCAGGTTGCGGTATTTCGAT	55
	4HBD-R	TTCGATGGTGGCATAGGTGG	
4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxyláza	4HPAHL-F	CGCAAGTCGTATGAAGCCAA	53
	4HPAHL-R	AAACGCAGCTTCACCATCAG	
4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxyláza	4HD3DL-F	TCAAGACCGGTAACCAGCAC	55
	4HD3DL-R	CGGCTGGAAGGTCATCTTGT	
PHA syntáza pro CN H16 na RT-qPCR, velikost 214 bp	q-phaC-F	GCCGTGCATCAACAAGTACT	55
	q-phaC-R	CACGTTGATCTTGTCTGCTGGC	

3.1.4 Použité kity

- izolační kity na izolaci DNA
 - Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England BioLabs, Velká Británie)
 - NucleoSpin® DNA (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo)
- izolační kity na izolaci RNA
 - NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo)
 - NucleoSpin® RNA/NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo)
 - Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs, Velká Británie)
- kity na reverzní transkripci (vznik komplementární DNA)
 - gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Česká republika)
 - LunaScript™ RT SuperMix Kit (New England BioLabs, Velká Británie)
 - First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Švýcarsko)

3.1.5 Přístroje

- blokový termostat Stuart SBH 200D (Bibby Scientific, Velká Británie)
- centrifuga AG 1-14 (Sartorius, Německo)
- centrifuga Quickspin (Cleaver Scientific Ltd, Velká Británie)
- inkubátor IP60 a IP100-U (LTE Scientific, Velká Británie)
- laboratorní váha EW 620-3NM (Kern, Německo)
- laboratorní váha Scout Pro (Ohaus, Švýcarsko)
- laminární box Fatran FL (Slovensko)
- nanofotometr Pearl (Implen, Spojené státy americké)
- napájecí zdroj ENDURO™ 300V (Labnet, Spojené státy americké)
- real-time PCR cykler Rotor-Gene™ 6000 (QIAGEN, Německo)
- systém pro snímání gelů c200 (Azure Biosystems, Spojené státy americké)
- thermal cycler MyCycler™ (BIO-RAD, Spojené státy americké)
- transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Spojené státy americké)
- vortex, BenchMixer Vortex Mixer (Benchmark Scientific, Spojené státy americké)
- plynový chromatograf s FID (Thermo Scientific, Trace 1300), kolona DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16

3.2.1 Příprava tekutého kultivačního média

Inokulum na kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* H16 bylo připraveno jako komplexní tekuté Nutrient Broth (NB) médium o koncentraci 25 g/l. Bylo připraveno v objemu 50 ml ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách a poté vysterilováno. Po sterilaci byla média zaočkována

750 µl bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16, která byla uchovávána ve formě kryozkumavek v 10 % glycerolu při –80 °C. Po zaočkování probíhala kultivace po dobu 24h, při teplotě 30 °C a otáčkách 180 rpm.

3.2.2 Příprava produkčního minerálního média pro analýzu genové exprese

Pro analýzu genové exprese vybraných genů zapojených do biosyntézy PHA bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla připravena produkční minerální média.

Objem minerálního média byl 100 ml a médium bylo připraveno ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách navážením jednotlivých složek média. Složky jsou uvedeny v následující tabulce 3 a po navážení byly všechny rozpuštěny ve 100 ml destilované vody.

Tabulka 3: Složení minerálního média

Složka	c [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
KH ₂ PO ₄	1,05
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2

Takto připravená média byla následně sterilována. Po sterilaci byla média připravena jednotlivě s rozdílným zdrojem uhlíku. Jako zdroj uhlíku byl zvolen roztok fruktózy o finální koncentraci 20 g/l v produkčním médiu a roztok γ-butyrolaktonu o koncentraci 8 g/l v produkčním médiu. Kromě zdroje uhlíku byl po sterilaci k médiím přidán vysterilovaný roztok stopových prvků (MES) o koncentraci 1 ml/l v produkčním médiu.

Složení roztoku stopových prvků (MES) uvádí následující tabulka 4.

Tabulka 4: Složení roztoku stopových prvků (MES)

Složka	c [g/l]
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,119
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,118
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
0,1 M HCl	1000 ml

Připravená minerální média byla zaočkována bakteriální kulturou, která byla předtím kultivována po dobu 24h na komplexním tekutém kultivačním NB médiu, 100 ml minerálního média bylo zaočkováno 10 ml bakteriální kultury. V takto připraveném produkčním médiu probíhala kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16 při teplotě 30 °C a při otáčkách 180 rpm. Vzorky byly odebírány po 4h a po překročení 24h od začátku kultivace byly odebírány po 12h. Poslední vzorek byl odebrán po 72h od zahájení kultivace.

3.2.3 Stanovení optické hustoty produkčních médií

Optická hustota (OD) byla stanovena u jednotlivých produkčních médií pomocí spektrofotometru NanoPhotometerTM Implen v 1 ml kyvetě při vlnové délce 630 nm. Optická hustota byla pro každé médium měřena třikrát, jako blank byla použita destilovaná voda.

3.2.4 Gravimetrické stanovení biomasy z produkčního média

Na stanovení hmotnosti biomasy byly nesterilně odebrány vzorky z jednotlivých produkčních médií. Bylo odebráno celkem 10 ml bakteriální kultury v duplikátu, vzorky byly následně odstředěny na centrifuze po dobu 5 minut při 6 000 otáčkách za minutu (rpm). Po odstředění byl vzorkům slit supernatant, k odstředěnému peletu přidáno 5 ml destilované vody a vzorky byly resuspendovány na vortexu. Po resuspendaci byly opět odstředěny na centrifuze po dobu 5 minut při 6 000 rpm. Po skončení centrifugace byl slit supernatant a získané vzorky biomasy sušeny do konstantní hmotnosti a posléze zváženy.

3.3 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie

Stanovení množství a koncentrace PHA ve vzorcích biomasy, odebraných z produkčních médií, bylo provedeno pomocí plynové chromatografie s FID detekcí (GC-FID).

Do krimpovacích vialek bylo naváženo 8–11 mg vysušené biomasy z produkčního média. Ke každému vzorku navážené biomasy byl poté přidán 1 ml chloroformu a poté 0,8 ml roztoku transesterifikační směsi. Transesterifikační směs byla tvořena 15 % kyselinou sírovou v methanolu s interním standardem, jímž byla kyselina benzoová o koncentraci 5 mg/ml. Takto připravená směs byla v uzavřených vialkách esterifikována po dobu 3h v termostatu temperovaném na teplotu 94 °C. Účelem této esterifikace bylo převedení netěkavých vysokomolekulárních PHA na těkavé methylestery 3-hydroxyalkanových kyselin, jež je možné bez problémů analyzovat pomocí plynové chromatografie.

Po esterifikaci následovala příprava vzorků methylesterů na GC. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml 50 mM NaOH, aby bylo docíleno neutralizace vzorků. Směs byla protřepána a bylo vyčkáno do oddělení organické a vodné fáze. Z oddělené organické fáze bylo odebráno 50 µl vzorku do čistých šroubovacích vialek předem naplněných 900 µl isopropanolu. Následovala analýza takto připravených vzorků pomocí GC-FID.

3.4 Izolace bakteriálních nukleových kyselin pro molekulárně biologická stanovení

3.4.1 Příprava lysozymu

Pro izolaci bakteriální DNA pomocí izolačního kitu Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England BioLabs, Velká Británie) byl připraven roztok lysozymu o koncentraci 25 mg/ml. Takto připravený roztok byl po použití uchováván při –20 °C.

Pro izolaci bakteriální RNA pomocí kitů NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo) a NucleoSpin® RNA/NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel GmbH &

Co.KG, Německo) byl připraven roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. Takto připravený roztok lysozymu byl po použití uchováván také při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Izolace DNA

Na izolaci DNA byly použity dva izolační kity, kit NucleoSpin® DNA (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel) a kit Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England BioLabs, Velká Británie; dále jako Monarch).

Při izolaci DNA z kitu Macherey-Nagel bylo třeba použít takové množství bakteriální kultury, aby hmotnost peletu byla přibližně 40 mg. Poté byla dle návodu kitu provedena resuspendace peletu ve 100 μl resuspendačního pufru. Z takto připraveného vzorku byla provedena izolace DNA. K resuspendovanému vzorku byly postupně přidány další pufrы a proteináza K, opět na základě přiloženého protokolu daného kitu. Rozbití buněk bylo provedeno v Eppendorfově zkumavce s resuspendačními kuličkami a pomocí vortexu. Po těchto krocích byla izolovaná DNA promyta promývacím pufrem až do vysušení kolony, na níž se izolovaná DNA nacházela. Eluce DNA byla provedena za použití 100 μl elučního pufru.

Při izolaci DNA kitem Monarch bylo rovněž třeba použít takové množství bakteriální kultury, aby hmotnost peletu byla přibližně 40 mg. K peletu byl přidán 5mM Tris-HCl (což je změna oproti návodu, kde byl uveden 10 mM Tris-HCl) a pelet byl resuspendován na vortexu. K resuspendovanému vzorku byl přidán roztok lysozymu o koncentraci 25 mg/ml a lyzační pufr dle přiloženého protokolu k danému kitu. Takto připravený vzorek byl inkubován při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Po inkubaci byla přidána proteináza K a proběhla další inkubace při teplotě $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Následně byla ještě přidána k lyzátu RNáza A, a po vortexu provedena poslední inkubace při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Po inkubacích byl k lyzátu přidán vázací pufr, membrána byla vyčištěna na centrifuze a vzorek byl několikrát promyt promývacím pufrem. Na eluci bylo použito 50 μl elučního pufru.

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované bakteriální DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí spektrofotometru NanoPhotometer™ Implen (lid 10). Jako blank byl použit eluční pufr použitý v posledním kroku izolace DNA. Výsledná koncentrace DNA byla uvedena v jednotkách ng/ μl . Čistota byla stanovena poměrem absorbancí vlnových délek 260 nm ku 280 nm, hodnota tohoto poměru A_{260}/A_{280} se pro čistou DNA pohybuje kolem 1,8.

3.4.3 Izolace RNA

Na izolaci RNA byly použity celkem tři kity, kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel Plus), NucleoSpin® RNA/NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel) a Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs, Velká Británie; dále jako Monarch).

U všech kitů byla provedena enzymatická lyze, u kitu Monarch byla použita i lyze mechanická. Na izolaci za použití kitu Macherey-Nagel při enzymatické lyzi bylo odpipetováno 200 μl bakteriální kultury, která byla odstředěna na centrifuze a po slití supernatantu byl k peletu přidán roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. Takto připravený roztok byl po promíchání na vortexu inkubován ve vodní lázni na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Po inkubaci byl k tomuto

roztoku přidán β -merkptoethanol a dle návodu daného kitu byly postupně přidány vázací pufrы a následně byla RNA několikrát promyta promývacími pufrы. Poté byla izolovaná RNA eluována ve 100 μ l RNase-free vody.

Izolace pomocí kitu Macherey-Nagel Plus při enzymatické lyzi byla velmi podobná izolaci kitem Macherey-Nagel. Na pelet bylo použito 200 μ l bakteriální kultury a po resuspendaci v Tris/EDTA pufru (dále jako TE pufr) byl přidán roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. Po promíchání na vortexu byl roztok inkubován ve vodní lázni na 37 °C po dobu 10 minut. Po sérii vázacích pufrů a několikanásobném promytí byla RNA eluována v 60 μ l RNase-free vody.

Na izolaci kitem Monarch při mechanické lyzi bylo rovněž použito 200 μ l připravené bakteriální kultury. Na mechanickou lyzi byly přidány reagenty uvedené pro tento krok dle návodu kitu a po jejich přidání byly buňky resuspendovány na vortexu. Podle návodu kitu byla opět RNA izolována za přidání vázacích pufrů a několikrát přečištěna promývacími pufrы. Na závěr byla izolovaná RNA eluována ve 100 μ l RNase-free vody. Při enzymatické lyzi oproti návodu probíhala inkubace jiným způsobem. Byla vyzkoušena resuspendace pomocí RNA lyzačního pufru v kitu, ale i pomocí TE sterilního pufru. Po resuspendaci byl k získanému peletu přidán lysozym o koncentraci 1 mg/ml a připravený roztok inkubován na 37 °C po dobu 10 minut. Další kroky probíhaly stejně jako u lyze mechanické a na závěr proběhla eluce opět za použití 100 μ l RNase-free vody.

Ověření integrity RNA a stanovení její koncentrace a čistoty

Koncentrace a čistota RNA bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla stanovena spektrofotometricky pomocí spektrofotometru NanoPhotometerTM Implen (lid 10). Jako blank byla použita RNA-free voda. Výsledná koncentrace RNA byla měřena v jednotkách μ g/ml. Čistota byla poté stanovena poměrem absorbancí A_{260}/A_{280} při vlnových délkách 260 nm ku 280 nm. Čistá RNA vykazuje hodnotu poměru absorbancí A_{260}/A_{280} kolem 2,0 a byla sledována taktéž pomocí agarózové gelové elektroforézy, na kterou byl použit 1,5 % agarózový gel. Integrity RNA byla ověřena poměrem absorbancí A_{260}/A_{230} při vlnových délkách 260 nm ku 230 nm. Tato hodnota by u RNA neměla klesnout pod hodnotu 0,5.

3.4.4 Reverzní transkripce izolované RNA

Na reverzní transkripci RNA pro vznik cDNA byly použity celkem tři kity, LunaScriptTM RT SuperMix Kit (New England BioLabs, Velká Británie, dále jako Luna Script); First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Švýcarsko; dále jako Roche) a gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Česká republika; dále jako Generi Biotech).

Pro převod z kitu Luna Script byly připraveny pokaždé tři vzorky, konkrétně vzorek s RNA a reverzní transkriptázou, vzorek s RNA bez reverzní transkriptázy, směs byla značena jako NO-RT, a vzorek s reverzní transkriptázou bez RNA. Druhá a třetí směs byly použity jako negativní kontroly pro první vzorek. Celkový objem, který byl použit na převod za použití tohoto kitu, byl 20 μ l a těchto 20 μ l mohlo obsahovat max. 1 μ g izolované RNA. K takto připraveným vzorkům RNA byly přidány všechny ostatní komponenty jako reverzní transkriptáza (RT) nebo směs NO-RT a do celkových 20 μ l byly pak vzorky adekvátně doplněny nuclease-free vodou. Po přidání všech komponent byly vzorky vloženy

do termocykleru a následně proběhla reverzní transkripce. Podmínky pro tuto reakci byly 2 minuty 25 °C na primer-annealing, 10 minut 55 °C syntéza cDNA a 1 minuta 95 °C tepelná inaktivace.

Pro převod za použití kitu Roche byly dle návodu použity jen vzorky izolovaných RNA, pozitivní ani negativní kontrola nebyla vyžadována. Množství RNA ve vzorku pro převod se mělo pohybovat v rozmezí od 1 ng do 4 µg. Ke vzorkům o nízké koncentraci nukleové kyseliny měl být přidán stabilizátor RNA. Ke všem vzorkům byly poté ještě přidány další komponenty z kitu. Po přidání všech složek byly vzorky krátce stočeny a následně byly vzorky zahřívány na 65 °C po dobu 10 minut v termocykleru. Poté byly vzorky ihned uchovávány na ledu a byly k nim přidány zbývající komponenty z kitu na výsledný objem 20 µl. Následně byly vzorky podrobeny reverzní transkripci po dobu 30 minut při teplotě 55 °C a poté ještě 5 minut při teplotě 85 °C.

Pro převod kitem Generi Biotech byly použity podle návodu jen vzorky izolovaných RNA, nebyla nutná žádná negativní ani pozitivní kontrola a celá příprava sestávala pouze z několika kroků. Celkový objem směsi pro následné RT-PCR byl, stejně jako u předchozích, 20 µl, a množství RNA v těchto 20 µl se mělo pohybovat v rozmezí 100–1000 ng RNA. Po doplnění dalších komponent a vody byly připravené směsi podrobeny reverzní transkripci v termocykleru při teplotě 42 °C po dobu 60 minut.

Stanovení koncentrace a čistoty získané cDNA

Koncentrace a čistota vzniklé cDNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí spektrofotometru NanoPhotometerTM Implen (lid 10). Jako blank byla použita nuclease free voda. Výsledná koncentrace cDNA byla měřena v jednotkách µg/ml. Čistota byla poté stanovena poměrem absorbancí A_{260}/A_{280} při vlnových délkách 260 nm ku 280 nm. Čistá cDNA vykazuje hodnotu poměru absorbancí A_{260}/A_{280} mezi 1,7–1,8.

3.4.5 Agarózová gelová elektroforéza

Pro přípravu agarózového gelu a pro elektroforetický pufr byl připraven 10krát koncentrovaný Tris-borát-EDTA pufr (dále jako TBE pufr) navážením a rozpuštěním níže uvedených složek v demineralizované Mili-Q vodě.

Složení a zastoupení jednotlivých složek v 10krát koncentrovaném pufru uvádí tabulka 5.

Tabulka 5: Složení 10krát koncentrovaného TBE pufru

Složka	c [g/l]
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108
H ₃ BO ₃	55
EDTA	9,3
demineralizovaná Mili-Q voda	1000 ml

Zředěním 10krát koncentrovaného TBE pufru demineralizovanou Mili-Q vodou v následujícím poměru 1 : 9 byl připraven 1krát koncentrovaný TBE pufr.

Pro elektroforézu byl připraven 1,5 % agarózový gel v 1krát koncentrovaném TBE pufru. K tomu bylo po rozpuštění agarózy přidáno barvivo Midori Green sloužící k vizualizaci

jednotlivých fragmentů DNA. Nadbytečné množství připraveného gelu bylo odříznuto a uchováno v 1krát koncentrovaném TBE pufru v lednici pro další použití.

Do jamek připraveného gelu bylo nanášeno 10 μ l směsi, která byla připravena smícháním 10 μ l DNA a 3 μ l nanášecího pufru Yellow load. Pro analýzu RNA bylo nanášeno vždy do nového gelu 7 μ l směsi připravené smícháním 7 μ l RNA a 3 μ l nanášecího pufru Yellow load. Pro srovnání velikostí fragmentů bylo do jedné jamky nanášeno 5 μ l standardu o definovaných velikostech fragmentů DNA.

Agarózový gel byl následně vložen do elektroforetické vany a dostatečně zalit 1krát koncentrovaným TBE puforem. Připojením ke zdroji napětí byla spuštěna elektroforéza, která probíhala při napětí 90 V po dobu 30 minut. Po skončení elektroforézy byl gel pozorován na UV transiluminátoru.

3.5 Optimalizace metody PCR a RT-qPCR

3.5.1 Příprava primerů

Pro optimalizaci metod PCR pro studium genové exprese byly použity primery 16S, 4HBD, 4HPAHL, 4HD3DL, q16S a q-phaC. Kromě q-phaC primerů byly použity již připravené zásobní roztoky primerů, které ve své diplomové práci použila Eliška Kubáčková [45]. Primery q-phaC byly po dodání v lyofilizovaném stavu jednotlivě naředěny sterilní vodou dle návodu výrobce.

Z výše uvedených zásobních roztoků jednotlivých primerů byly dalším ředěním připraveny roztoky primerů pro PCR směsi. Primery použité pro klasickou PCR (16S, 4HBD, q-phaC) byly ředěny 20krát. Primery, jež byly použity pro RT-qPCR (q16S, 4HBD, 4HPAHL, 4HD3DL, q-phaC), byly ředěny 5krát, 10krát a 20krát.

Zásobní roztoky jednotlivých primerů byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Optimalizace annealingu pro klasickou PCR

Složení reakční směsi a teplotní program klasické PCR bylo provedeno na základě diplomové práce Elišky Kubáčkové [45]. Reakce klasické PCR probíhala v celkovém objemu 25 μ l při annealingové teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Složení reakční směsi uvádí následující tabulka 6.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro klasickou PCR

Složka	V [μ l]
Master mix (OneTaq Hot Start DNA Polymerase)	12,5
Primer-F (přední)	1
Primer-R (zadní)	1
DNA bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	2
PCR voda	8,5

Teplotní program klasické PCR je podrobněji popsán níže v tabulce 7.

Tabulka 7: Teplotní program pro klasickou PCR

Krok	Proces	t [°C]	t [s]
1	Denaturace	94	30
2	Annealing	55	30
3	Extenze	72	30

Výše uvedené složení a teplotní program s již optimalizovanou teplotou annealingu z diplomové práce Elišky Kubáčkové [45] byly použity pro všechny primery kromě primerů phaC, pro něž musela být annealingová teplota optimalizována. Optimalizace annealingové teploty pro tyto primery byla provedena za použití gradientové PCR, pro kterou byly zvoleny teploty v rozmezí 48–60 °C. PCR směsi byly připraveny jednotlivě pro vybrané teploty zvoleného teplotního gradientu.

Složení PCR směsi pro gradientovou PCR detailně popisuje následující tabulka 8.

Tabulka 8: Složení PCR směsi pro gradientovou PCR

Složka	V [μl]
Master mix (OneTaq Hot Start DNA Polymerase)	12,5
phaC-F primer (přední)	1
phaC-R primer (zadní)	1
DNA bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	1
PCR voda	9,5

Po přípravě PCR směsi byly vzorky vloženy do termocycleru, každý vzorek byl umístěn do jiné jamky na jamkové destičce s konkrétní teplotou annealingu. Negativní kontrola (NK) byla umístěna do jamky s annealingovou teplotou 53 °C. Tato teplota byla očekávána jako jedna ze vhodných annealingových teplot. Úspěšnost gradientové PCR byla posléze ověřena pomocí gelové elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu.

Podrobné kroky teplotního programu gradientové PCR znázorňuje následující tabulka 9.

Tabulka 9: Teplotní program gradientové PCR

Krok	Proces	t [°C]	t [s]	Počet cyklů
1	Denaturace DNA	94	30	1
2	Denaturace DNA	94	30	30
	Annealing	48-60	30	
	Syntéza úseku DNA	68	90	
3	Syntéza úseku DNA	68	300	1
	Uchování vzorků	4	60	1

Po výběru vhodné annealingové teploty pro phaC primery byla tato vybraná teplota, resp. rozsah teplot, aplikován na RT-qPCR a byla vybírána nejvhodnější délka annealingu.

3.5.3 Optimalizace annealingu pro RT-qPCR

Annealing pro RT-qPCR byl pro primery q16S, 4HBD, 4HPAHL a 4HD3DL postupně optimalizován při různých podmínkách v teplotním rozsahu 50–60 °C a annealingovou dobou 30–60 sekund. Pro kalibraci byly použity primery q16S, jejichž teplotní program se oproti ostatním lišil v annealingové teplotě i době, jelikož program probíhal při teplotě 60 °C po dobu 60 sekund. Rovněž pro phaC primery se výsledný teplotní program odlišoval od ostatních primerů. Byly použity teploty, jež byly vybrány jako nejvhodnější na základě gradientové PCR a doba annealingu pro phaC primery byla postupně zkoušena pro časové rozmezí 15–45 sekund.

Teplotní program pro RT-qPCR je popsán v níže uvedené tabulce 10.

Tabulka 10: Teplotní program RT-qPCR

Krok	Proces	t [°C]	t [s]
1	Denaturace	94	30
2	Annealing	50-60	15-60
3	Extenze	72	30

Optimalizace byla zkoušena i pro různá množství jednotlivých primerů, předního i zadního, od 0,5 μ l do 2,5 μ l s krokem 0,5 μ l. Podobným způsobem bylo zkoušeno i množství templátu DNA bakterie *Cupriavidus necator* H16. Postupně byly vyzkoušeny různé objemy templátu od 1 μ l, 2 μ l až po 5 μ l. Při každém měření byla taktéž provedena pozitivní kontrola (PK) s genomickou bakteriální DNA, a negativní kontrola (NK), pro kterou byla místo bakteriální DNA použita PCR voda.

Zastoupení jednotlivých složek uvádí následující tabulka 11.

Tabulka 11: Složení reakční směsi pro RT-qPCR

Složka	V [μ l]
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
Primer-F (přední)	1
Primer-R (zadní)	1
Templát DNA bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	1
PCR voda	9,5

3.5.4 Analýza RT-qPCR dat pro studium genové exprese

Průběh amplifikace úseků vybraných genů byl zaznamenán pomocí softwaru přístroje real-time PCR cykler Rotor-GeneTM 6000. Byly zaznamenány hodnoty C_t (cycle threshold) a intenzita fluorescence. Pro každý vybraný gen byla sestrojena kalibrační přímka, na niž byla použita izolovaná genomická DNA. Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace genů.

Dále byla získaná data pro účely studia exprese genů vyhodnocena pomocí relativní kvantifikace. Z metod používaných pro relativní kvantifikaci byla použita Livakova metoda. Relativní kvantifikace funguje v tomto případě na principu vztažení výsledků genové exprese konkrétního genu k referenčnímu genu. V této práci byl jako referenční gen pro svou neměnnou genovou expresi zvolen housekeeping gen. Pro výpočet relativní kvantifikace pomocí Livakovy metody byly použity následující rovnice.

$$\Delta C_t(\text{analyzovaný gen}) = C_t(\text{analyzovaný gen}) - C_t(\text{referenční analyzovaného genu}) \quad (1)$$

$$\Delta C_t(\text{kalibrátor}) = C_t(\text{kalibrátor}) - C_t(\text{referenční ke kalibrátoru}) \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{analyzovaný gen}) - \Delta C_t(\text{kalibrátor}) \quad (3)$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{výsledek relativní kvantifikace} \quad (4)$$

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo sledování exprese genů zapojených do biosyntézy PHA u bakterie *Cupriavidus necator* H16. Pro tyto účely byly použity metody PCR a RT-qPCR. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 je využívána jako modelová pro metabolismus PHA.

Obecně měření genové exprese slouží k lepšímu pochopení daného metabolismu, v případě PHA produkujících bakterií metabolismu a produkce PHA. Cílem je najít co nejlepší podmínky, při kterých by bylo dosahováno vysokých výtěžků PHA, zvýšit celkově produkci PHA a zvednout tak konkurenceschopnost PHA.

4.1 Porovnání komerčních kitů na izolaci nukleových kyselin bakterií

Jedním z prvních kroků této práce byla izolace nukleových kyselin DNA a zejména pak RNA. DNA byla získána izolací z bakteriální kultury kultivované v tekutém kultivačním médiu a poté byla používána pro optimalizaci PCR metod, kalibrace a také jako pozitivní kontrola při PCR měřeních. RNA byla izolována ze vzorků bakteriální kultury odebraných při kultivaci za různých podmínek. Následně byla získaná RNA převáděna pomocí reverzní transkripce na komplementární DNA a použita na studium genové exprese.

Práce s RNA vyžaduje oproti práci s DNA vyšší nároky na čistotu a sterilitu prostředí z důvodu poměrně snadné kontaminace a zejména degradace RNA v přítomnosti RNáz. Proces degradace probíhá od konců RNA pomocí exonukleáz, které štěpí od 5' nebo 3' konce RNA, anebo uvnitř vlákna pomocí endonukleáz. Každá RNA, která není chráněna proti účinkům RNáz, je okamžitě degradována [46].

Izolace obou nukleových kyselin byla provedena za použití specifických izolačních kitů. Kitů bylo k dispozici více, nicméně každý z nich se lišil v postupu a někdy i v použitých chemikáliích. Cílem bylo proto vybrat ze všech kitů ten, který by byl nejvhodnější, a protože byly kity určeny pro univerzitní účely, tak nejvhodnější pro studentské účely. Práce s kitem by pro tyto účely měla být snadná, rychlá a dobře pochopitelná. Zároveň by měla být bezpečná, a co nejvíce by se při ní mělo eliminovat použití nebezpečných látek (toxických, žíravých či jakkoli jinak zdraví škodlivých). Nadto všechno byl kit vybírán i podle výsledných výtěžků izolované nukleové kyseliny.

4.1.1 Porovnání komerčních kitů pro izolaci bakteriální DNA

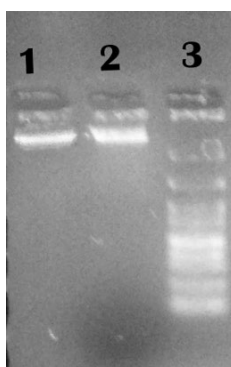
Izolace DNA pro molekulární metody byla provedena za použití izolačních kitů od firem Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England BioLabs, Velká Británie; dále jako Monarch) a NucleoSpin® DNA (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel). Lyze byla provedena mechanicky nebo enzymaticky.

Po izolaci byla stanovena koncentrace a čistota izolované DNA spektrofotometricky pomocí nanospektrofotometru. Pro izolaci DNA bylo pipetováno 1,5 ml připravené bakteriální kultury.

Hodnota změřených koncentrací DNA se pohybovala v rozmezí řádů desítek až stovek ng/μl pro DNA, což je pro použití metody PCR dle požadavků použitého Master mixu *Taq* DNA polymerázy (<1 000 ng/μl) PCR směsi dostačující koncentrace. Nicméně hodnoty naměřených koncentrací DNA se vzájemně mezi jednotlivými kity lišily. Zatímco koncentrace DNA izolovaná z kitu Monarch činila 229 ng/μl, z kitu Macherey-Nagel byla nejvyšší koncentrace 56 ng/μl. Získanou koncentraci významně také ovlivnil typ lyze, jelikož při izolaci za použití kitu Monarch probíhala lyze enzymaticky za použití roztoku o poměrně vysoké koncentraci lysozymu (25 mg/ml) a poté byla inkubována s tímto roztokem při teplotě 56 °C po dobu 30 minut, u kitu Macherey-Nagel probíhala lyze pouze v řádu minut za použití resuspendačních kuliček. Práce s kitem Monarch sice byla časově náročnější než s kitem Macherey-Nagel, nicméně byla snadná, a i návod přiložený k tomuto kitu byl mnohem srozumitelnější než návod ke kitu Macherey-Nagel. Jako vhodnější byl tedy zvolen kit od firmy Monarch.

Čistota izolovaných DNA stanovená poměrem absorbancí A_{260}/A_{280} byla naměřena v rozmezí hodnot 1,60–2,15. Většina vzorků izolované DNA dosahovala hodnoty poměru absorbancí kolem 1,8, což je hodnota odpovídající čisté DNA. Nižší hodnoty než 1,8 mohly být způsobeny kontaminací rozličnými proteiny, naopak hodnoty vyšší než 1,8 a zejména pak nad 2,0 mohly být způsobeny kontaminací RNA [47].

Úspěšnost izolace bakteriální DNA byla ověřena elektroforeticky na 1,5 % agarózovém gelu a obě izolované DNA jsou zobrazeny na obrázku 9. Získaná izolovaná DNA byla dále použita k charakterizaci bakteriálních izolátů pomocí molekulárních metod.



Obrázek 9: Izolovaná bakteriální DNA;
1 – DNA izolovaná za použití kitu Macherey-Nagel, 2 – DNA izolovaná za použití kitu Monarch, 3 – standard

4.1.2 Porovnání komerčních kitů pro izolace bakteriální RNA

Pro izolaci RNA byly použity kity od firem NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel Plus), NucleoSpin® RNA/NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo; dále jako Macherey-Nagel) a Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs, Velká Británie, dále jako Monarch).

Pro oba kity od firmy Macherey-Nagel byla použita enzymatická lyze a od firmy Monarch byl sice použit jeden kit, ale byla pro něj možná lyze mechanická i enzymatická. V této bakalářské práci byla enzymatická lyze provedena dle návodu (v tabulce označena jako enzymatická I) a poté ještě upravena a použita s TE pufrem (v tabulce uvedena jako enzymatická II), který byl použit pro všechny ostatní roztoky lysozymu. Je proto možné porovnat pro tento kit ve výsledku

dvě enzymatické lyze. TE pufr byl použit jako lyzační pufr i pro další kity. I proto byl v případě tohoto kitu použit také (byť to nebylo přímo uvedeno v návodu), aby bylo možné porovnat výsledky lyze pomocí tohoto pufru mezi všemi kity.

Pro izolace RNA bylo pipetováno 200 μ l připravené bakteriální kultury, s výjimkou enzymatické lyze u kitu Monarch, kdy bylo pipetováno 400 μ l bakteriální kultury.

Velmi důležitými kroky izolace RNA je použití purifikačních a vázacích kolonek. První kolonka použitá během samotného procesu slouží k odstranění gDNA, která by mohla způsobit kontaminaci RNA. Další kolonka slouží k vázání již vzniklé RNA a k její purifikaci pomocí sady promývacích pufrů a zbavení případných dalších kontaminantů, např. proteinů.

Po izolaci byla stanovena podobně jako u DNA koncentrace a čistota izolované RNA spektrofotometricky. Výsledné koncentrace izolovaných RNA byly měřeny v jednotkách μ g/ml. Podobně jako u DNA bylo i u těchto izolačních kitů dosaženo rozdílných výsledků.

Naměřené výsledné koncentrace bakteriální RNA izolované z jednotlivých kitů uvádí následující tabulka 12.

Tabulka 12: Výsledky izolace bakteriální RNA za použití různých komerčních izolačních kitů

kit	Macherey-Nagel	Macherey-Nagel Plus	Monarch	Monarch	Monarch
typ lyze	enzymatická	enzymatická	mechanická	enzymatická I	enzymatická II
c [μ g/ml]	32,5	30,5	6,413	16,0	6,814
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,841	2,171	1,600	1,739	1,700
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1,141	1,246	0,327	0,597	0,531

U obou izolačních kitů Macherey-Nagel bylo dosaženo významně lepších výsledků než u jakéhokoli použití kitu Monarch. Pozoruhodným jevem u kitu Monarch jsou velmi podobné výsledky pro mechanickou lyzi a enzymatickou lyzi za použití jiného lyzačního pufru, než toho uvedeném v návodu a poskytnutém v rámci kitu. Z toho je zřejmé, že pokud je rozhodnuto použít tento kit pro konkrétní měření a použít enzymatickou lyzi, je nezbytné držet se v případě lyze striktně návodu a postupovat jednotlivě krok po kroku, jak je uvedeno na kitu. Nicméně i tak je výsledný výtěžek stále poměrně nízký, navíc i čistota a integrita RNA dosáhly opravdu velice nízkých hodnot, proto nebyly izolační kity na RNA od firmy Monarch v práci dále používány.

Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo za použití izolačních kitů Macherey-Nagel a Macherey-Nagel Plus. Oba vyžadují použití enzymatické lyze, která pravděpodobně byla jedním z důvodů vyšších výsledných koncentrací oproti ostatním kitům. Ačkoli z kitu Macherey-Nagel byla koncentrace získané RNA nejvyšší, práci poměrně zneprůjemňuje použití β -merkapt ethanolu v jednom z počátečních kroků. O této látce je známo, že je toxická, zdraví škodlivá a velmi nepříjemného zápachu [48], což snižuje komfort při manipulaci se vzorky při izolaci a izolaci samotnou, a pro studentské použití by bylo mnohem vhodnější použití kitu, který využívá bezpečnější látky. Oproti tomu kit Macherey-Nagel Plus nevyžaduje použití žádné takovéto nebezpečné látky, práce je tím významně jednodušší, rychlejší, žádný z kroků

není komplikovaný a výtěžek je srovnatelný s výtěžkem z kitu Macherey-Nagel. Z těchto důvodů byl kit Macherey-Nagel Plus, vybrán jako nejvhodnější kit pro další měření.

Při měření čistoty RNA spektrofotometricky se hodnoty poměru absorbancí A_{260}/A_{280} pohybovaly v rozmezí 1,60 – 2,20, většina vzorků se pohybovala okolo hodnoty 1,70, nicméně pro čistou RNA by se tato hodnota poměru měla pohybovat okolo hodnoty 2,0 [47]. K této hodnotě se nejvíce blížila čistota RNA z kitu Macherey-Nagel Plus, což potvrzuje, že se jedná o kit, jež vede k vysokým výtěžkům a čistotě izolované RNA. Čistota RNA byla taktéž ověřena elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu.

4.1.3 Porovnání komerčních kitů pro reverzní transkripci izolované RNA

Izolovaná RNA byla podrobena reverzní transkripci za vzniku komplementární DNA (cDNA), která byla následně použita pro studium exprese genů pomocí metody RT-qPCR.

I pro tento úkon byly k dispozici různé kity a stejně jako v případě DNA a RNA byl hledán kit, u kterého by bylo dosaženo vysokých výtěžků, práce nebyla složitá a byla vhodná pro univerzitní účely a rovněž nebylo nutné použití zdraví škodlivých látek. Kit byl vybírán i podle podmínek, resp. tepelného programu, pro samotné RT-PCR, aby byly co nejjednodušší.

Existují dva typy RT-qPCR, jednokroková a dvoukroková. V případě jednokrokových kitů je kombinována reverzní transkripce a PCR reakce v rámci jednoho kroku (v rámci jedné zkumavky a pufru). Pro tuto reakce je možné použít pouze jeden enzym s reverzní transkriptázovou a polymerázovou aktivitou, anebo zvlášť dva enzymy reverzní transkriptázu a DNA polymerázu. Zároveň jednokroková reakce funguje pouze na principu použití sekvence specifických primerů, kdežto dva kroky dvoukrokové RT-qPCR probíhají ve dvou oddělených zkumavkách, v různých podmínkách, tj. s odlišnými optimalizovanými pufrů. Výhodami jednokrokové reakce může být např. její rychlost a vysoká reprodukovatelnost, zároveň díky menšímu počtu kroků hrozí menší riziko kontaminace reakční směsi. Naopak dvoukroková reakce je více flexibilní, co se týče použití a optimalizované reakční pufru a podmínky mohou být použity pro jednotlivé reakce [49].

Celkem byly pro reverzní transkripci použity tři kity, gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Česká republika; dále jako Generi Biotech), LunaScript™ RT SuperMix Kit (New England BioLabs, Velká Británie; dále jako Luna Script) a First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Švýcarsko, dále jako Roche). Co se týče typu reverzní transkripce a počtu kroků, všechny tři tyto kity fungují na principu dvoukrokové reakce.

Množství použité RNA se odvíjelo od její koncentrace, v případě potřeby byla naředěna na požadovanou koncentraci. Po reverzní transkripci byla změřena koncentrace cDNA na nanospektrofotometru. Koncentrace se pohybovala v rozmezí stovek až tisíců $\mu\text{g/ml}$ na základě použitého kitu.

Výsledky reverzní transkripce bakteriální převedené na cDNA pomocí testovaných kitů uvádí tabulka 13.

Tabulka 13: Výsledky reverzní transkripce bakteriální RNA za použití různých komerčních kitů

kit na izolaci RNA	typ lyze	kit na reverzní transkripci RNA		
		Monarch/Luna Script	Roche	Generi Biotech
		<i>c</i> [µg/ml]	<i>c</i> [µg/ml]	<i>c</i> [µg/ml]
Macherey-Nagel	enzymatická	117	1918	802
Monarch	mechanická	166	1518	436

Při reverzní transkripci byly pozorovány jednoznačně největší rozdíly mezi jednotlivými použitými kity. Vstupní RNA neměla na výslednou koncentraci cDNA veliký vliv, jelikož bylo RNA do reakční směsi přidáno vždy pouze množství v rozmezí uvedeném v návodu a tak, aby byla vždy vstupní koncentrace RNA z jakéhokoli kitu stejná, nebo velice podobná. Výslednou koncentraci tedy ovlivnil pouze kit a tepelný program RT-PCR, z tohoto důvodu ani nebylo zkoušeno převádět RNA z úplně všech izolačních RNA kitů na komplementární cDNA.

Nejnáročnější práce byla s kitem Roche, zahrnovala spoustu kroků a manipulace s jednotlivými složkami byla náročná (některé musely být např. uchovávány celou dobu na ledu), ale výsledná koncentrace cDNA byla bezkonkurenčně nejvyšší ze všech kitů.

Nejjednodušší a nejkratší, zahrnující vysloveně pár kroků a pár reakčních složek, byla práce s kitem Generi Biotech, výtěžky nebyly špatné, nicméně oproti kitu Roche nízké a také jakožto u jediného kitu byly pozorovány výrazné rozdíly mezi RNA získanou z různých izolačních RNA kitů. Z tohoto důvodu se nedá na kit zcela spoléhat, že budou výtěžky reprodukovatelně dostačující. Ale pro svou jednoduchost a naprostou bezpečnost by bylo možné tento kit také používat pro další měření.

Práce s kitem Luna Script od firmy Monarch nebyla sice ani tak náročná jako s kitem Roche a ani tak jednoduchá jako s kitem Generi Biotech, ale vedla k naprosto nejnižším výtěžkům, navíc návod nebyl vždy intuitivní. Tento kit tak nemá oproti ostatním žádnou přednost a nelze jej tak doporučit pro další použití.

Jako nejlepší kit byl vybrán kit od firmy Roche, se kterým je sice práce náročnější, ale je bezpečná, jednotlivé kroky jsou dobře vysvětleny a zejména vede k vysokým výtěžkům, které jsou velmi podobné pro vstupní RNA z různých kitů.

4.2 Detekce vybraného úseku *phaC* genu kódujícího PHA syntázu I. třídy u bakterie *Cupriavidus necator* H16

PHA syntáza je klíčovým enzymem pro vznik polyhydroxyalkanoátů a je kódována *phaC* genem. U bakterie *Cupriavidus necator* H16 je PhaC syntáza známa již dlouho, popsána a rovněž celá osekvenována. Pro detekci pomocí PCR a stanovení pomocí RT-qPCR bylo potřeba vybrat kratší úsek tohoto genu, z toho důvodu byly navrženy nové primery, pro které bylo nezbytné najít vhodnou annealingovou teplotu.

4.2.1 Optimalizace annealingové teploty pomocí gradientové PCR

Pro zvolené vhodné annealingové teploty byla použita gradientová PCR, která proběhla pro celkem osm různých teplot, konkrétně 49,1 °C; 51,4 °C; 52,5 °C; 53,5 °C; 54,5 °C;

55,5 °C; 56,6 °C; 57,7 °C a 58,9 °C. Elektroforetické ověření výsledku PCR ukázalo, že nejvhodnějšími teplotami annealingu byly teploty 53,5 °C; 54,5 °C; a 55,5 °C.

Gel ukazující výsledek gradientové PCR je zobrazen na obrázku 10. Optimální annealingovou teplotou pro detekci PHA syntázy byla zvolena teplota 53 °C.



Obrázek 10: Výsledek gradientové PCR pro optimalizaci annealingové teploty
1 - 49,1 °C; 2 - 51,4 °C; 3 - 53,5 °C; 4 - 54,5 °C; 5 - 55,5 °C; 6 - 56,6 °C; 7 - 57,7 °C; 8 - 58,9 °C; 9 – standard pro DNA;
10 – negativní kontrola při 53,5 °C

4.3 Optimalizace metody RT-qPCR pro studium exprese genů

Pro analýzu genové exprese zvolených genů při různých podmínkách kultivace pro produkci PHA bylo využito metody RT-qPCR. Byly studovány geny, jež kódují vybrané proteiny, které se zapojují do metabolismu PHA.

Jako templát pro kvantifikaci úseků DNA vybraných genů byla při optimalizaci použita zejména genomická DNA získaná izolací pomocí dříve popsanych kitů, a dále komplementární DNA získaná reverzní transkripcí vybraných molekul izolované RNA pomocí, rovněž dříve, popsanych kitů.

Jako housekeeping gen byl vybrán gen kódující 16S rRNA a pro tento gen byly použity primery 16S. Dále byly použity primery 4HBD (pro gen kódující 4-hydroxybutyrát dehydrogenázu), 4HPAHL (pro gen kódující 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu), 4HD3DL (pro gen kódující 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu) a q-phaC (pro gen kódující PHA syntázu u *Cupriavidus necator* H16).

Při optimalizaci byla testována koncentrace všech výše vyjmenovaných primerů v rozsahu koncentrací, jež byly přiloženy v manuálu qPCR 2x SYTO-9 Master Mix. Rozsah těchto koncentrací pro přední i zadní primer byl 0,1–1 µM. Primery byly ředěny 5krát, 10krát a 20krát, což odpovídá koncentracím dle návodu qPCR 2x SYTO-9 Master Mix shrnutých v tabulce 14.

Kromě koncentrace primerů byla testována i doba annealingu a také teplota, zejména pokud na gradientové PCR měla teplota širší rozsah.

Výsledné podmínky pro všechny použité primery jsou shrnuty v následující tabulce 14.

Tabulka 14: Optimalizované podmínky pro použité primery

primer	ředění [krát]	<i>c</i> [μM]	<i>t</i> _A [°C]	<i>t</i> _A [s]
q16S	10	0,4	60	60
4HBD	5	0,8	53	30
4HPAHL	5	0,8	53	30
q-phaC	10	0,4	53	15

Při použití 4HD3DL primerů bylo opakovaně dosahováno velmi nízké intenzity fluorescence, proto tyto primery nebyly dále používány. Místo nich byla vybrána sada primerů 4HPAHL, jelikož mají obě sady stejný cílový kódující gen. U všech použitých primerů byl jako ideální objem zvolen 1 μl každého z použitých primerů (ředěných na stejnou koncentraci), jelikož také nebyly pozorovány zásadní rozdíly mezi přidanými objemy jednotlivých primerů. Primery zředěné 20krát odpovídají dle qPCR 2x SYTO-9 koncentraci 0,2 μM a opakovaně bylo při jejich použití dosahováno velmi nízké intenzity fluorescence, proto byly z dalších měření zcela vyřazeny.

Jako nejvhodnější objem templátu bakteriální genomické i komplementární DNA byl vybrán 1 μl. Nebyly totiž pozorovány zásadní rozdíly v intenzitě fluorescence pro vyšší objemy přidané templátové DNA, přestože se zvýšením objemu DNA se zvýšila i její koncentrace ve výsledné PCR směsi.

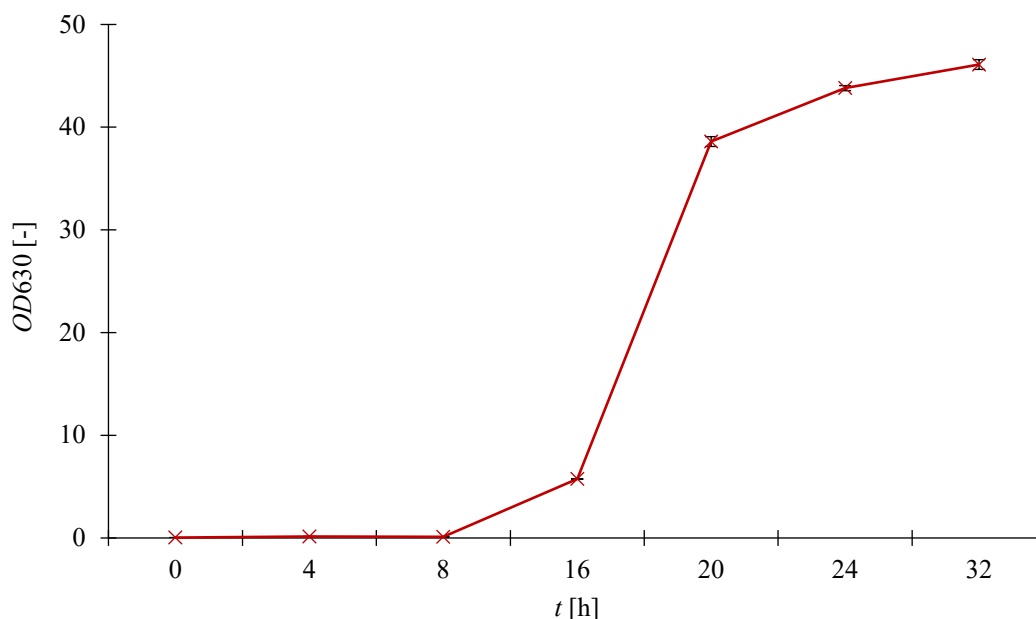
4.4 Studium genové exprese bakterie *Cupriavidus necator* H16 za různých kultivačních podmínek

Pro studium genové exprese byla bakteriální kultura kultivována na dvou odlišných zdrojích uhlíku, a to na fruktóze a γ-butyrolaktonu. Na těchto zdrojích uhlíku dochází k různé produkci PHA z pohledu absolutního množství vzniklého PHA a zastoupení monomerů. Kromě minerálního média s různými zdroji uhlíku byla genová exprese měřena také na vzorcích kultury odebírané z komplexního média. Genová exprese byla měřena v různých časových intervalech růstové křivky bakteriální kultury. Vzorky byly odebrány v časech 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 36h, 48h, 60h a 72h od zahájení kultivace. Byla stanovena optická hustota (OD) při 630 nm a gravimetricky stanovena biomasa. Ze vzorků biomasy bylo následně zjištěno zastoupení a složení získaného PHA pomocí plynové chromatografie. Dále byla z odebraných vzorků izolována RNA, použitá následně na reverzní transkripci, a získaná cDNA byla použita na samotné studium exprese genů pomocí RT-qPCR.

4.4.1 Stanovení optické hustoty

Optická hustota (OD) byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 630 nm ihned po odběru každého vzorku.

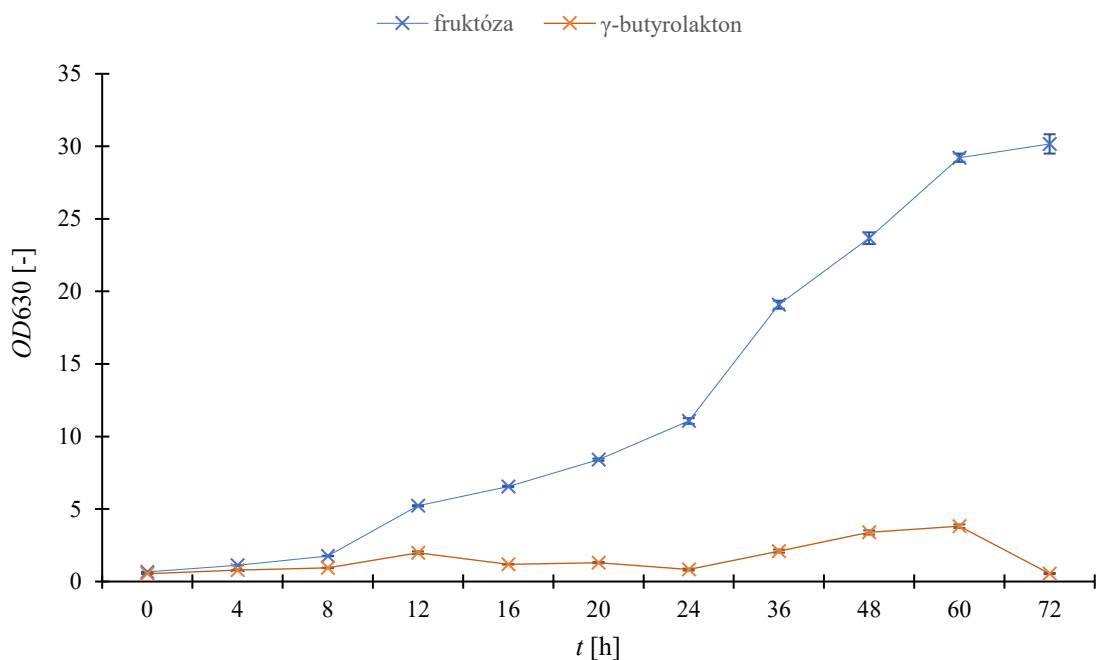
Přehled naměřených hodnot OD pro komplexní médium jsou shrnuty na obrázku 11.



Obrázek 11: Optická hustota (OD) při 630 nm pro bakteriální kulturu získanou z komplexního média

Optická hustota vzorků odebraných z bakteriální kultury kultivované na komplexním médiu vykazuje v prvních hodinách kultivace velmi nízké hodnoty, nicméně od odběru v čase 16h dochází již k pozvolnému nárůstu a od odběru v čase 20h je již možné pozorovat velmi vysoké hodnoty OD. Křivka optické hustoty tak v podstatě kopíruje klasickou růstovou křivku mikroorganismů, kdy se v prvních hodinách kultivace jedná o lag fázi a po nárůstu OD přibližně v čase mezi 16h a 20h od zahájení kultivace přechází křivka do exponenciální fáze. Okolo 24h od začátku kultivace byla kultura použita na zaočkování produkčního minerálního média. Z grafu je patrné, že v té době se kultura nacházela na rozhraní exponenciální a stacionární fáze. Po 24h se křivka postupně dostává do stacionární fáze. Fáze odumírání pozorována v tomto případě nebyla, jelikož byl experiment ukončen dříve.

Následující obrázek 12 popisuje výsledky optické hustoty pro produkční média obsahující fruktózu anebo γ -butyrolakton.



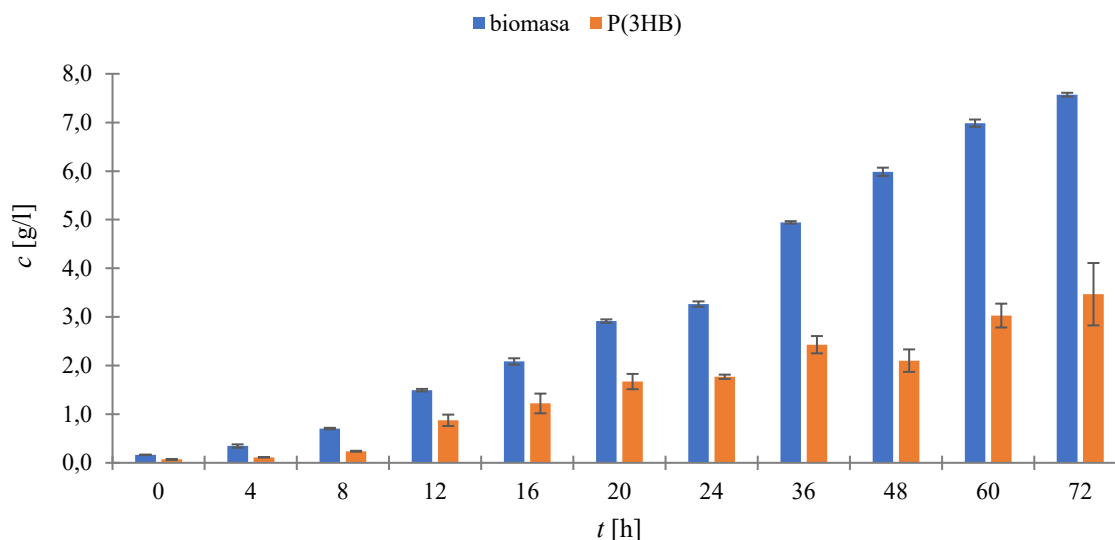
Obrázek 12: Optická hustota (OD) při 630 nm pro bakteriální kulturu získanou z produkčního média obsahujícího fruktózu nebo γ -butyrolakton

V případě kultivace na produkčním minerálním médiu obsahujícím γ -butyrolakton nebyla pozorována výraznější změna naměřených hodnot OD během kultivace, nebyl zaznamenán klasický průběh růstové křivky, chybí zejména výrazný přechod do exponenciální fáze. Po 60h od zahájení kultivace byla zaznamenána již fáze odumírání. Tento průběh růstové křivky mohl být zapříčiněn inhibičními účinky γ -butyrolaktonu, což zapříčiňuje poměrně nízký a pomalý růst kultury. V případě kultivace na fruktóze opět nemá růstová křivka klasický průběh. V tomto případě se ale křivka ani nedostala z exponenciální fáze do fáze stacionární.

4.4.2 Stanovení obsahu a množství PHA pomocí GC-FID

U vzorků odebraných z produkčních médií byla nejprve gravimetricky stanovena hmotnost získané vysušené biomasy a následně pomocí GC-FID stanoven obsah poly-3-hydroxybutyrátu P(3HB) u vzorků získaných z fruktózy a poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) P(3HB-co-4HB) u vzorků biomasy po kultivaci na γ -butyrolaktonu.

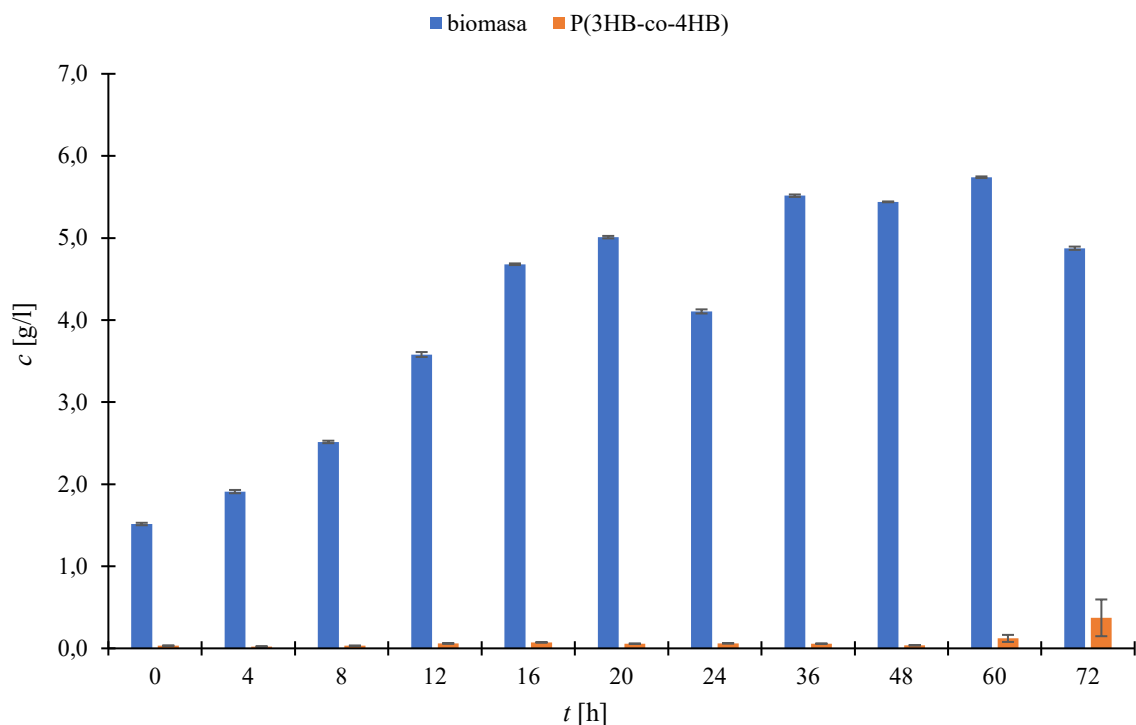
Výtěžky biomasy a P(3HB) z kultivace na fruktóze shrnuje obrázek 13.



Obrázek 13: Výtěžky biomasy a P(3HB) z kultivace na fruktóze

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 je schopna využít fruktózu velmi dobře jako zdroj uhlíku pro růst a produkci PHA a konkrétně P(3HB) [50]. Lze proto pozorovat postupný nárůst koncentrace tohoto biopolymeru v čase. Nicméně, ačkoli se fruktóza v produkčním minerálním médiu vyskytovala v poměrně vysoké koncentraci (20 g/l), výsledné množství monomeru 3-hydroxybutyrátu 3HB, jež tvoří polymer P(3HB), tvořilo pouze přibližně 30–50 % suché hmotnosti biomasy. To je u této bakterie poměrně málo, jelikož je běžně schopna vytvářet takové množství P(3HB) odpovídající až 90 % její suché hmotnosti [14]. Tyto nižší výtěžky PHA mohou taktéž korelovat s nižší expresí vybraných genů.

Výtěžky biomasy a P(3HB-co-4HB) a zastoupení jednotlivých monomerů v kopolymeru P(3HB-co-4HB) u vzorků získaných z kultivace na γ -butyrolaktonu shrnují obrázek 14 a tabulka 15.



Obrázek 14: Výtěžky biomasy a P(3HB-co-4HB) z kultivace na γ -butyrolaktonu

Tabulka 15: Zastoupení jednotlivých monomerů v P(3HB-co-4HB) získaného z kultivace na γ -butyrolaktonu

vzorek	t [h]	c (PHA) [g/l]	w (4HB) [mol.%]
G0	0	0,033	0,0
G4	4	0,022	0,0
G8	8	0,032	3,5
G12	12	0,060	8,7
G16	16	0,073	9,7
G20	20	0,057	14,5
G24	24	0,061	16,6
G36	36	0,057	16,9
G48	48	0,037	21,3
G60	60	0,121	19,4
G72	72	0,372	6,8

Na rozdíl od fruktózy neumí studovaná bakterie *Cupriavidus necator* H16 využít γ -butyrolakton pro produkci PHA tak efektivně jako fruktózu, což vedlo k nižším výtěžkům celkové biomasy a rovněž získaného PHA. Nadto se γ -butyrolakton nacházel v produkčním minerálním médiu pouze v koncentraci 8 g/l, tedy koncentraci 2,5krát nižší, než tomu bylo v případě fruktózy, což mělo taktéž pravděpodobně vliv na výsledné výtěžky PHA. Nicméně tento uhlíkový substrát je bakterie schopna využít pro produkci kopolymerů, v tomto případě byl konkrétně získán P(3HB-co-4HB). Získání tohoto PHA nese obecně řadu výhod, jelikož má jiné mechanické a fyzikální vlastnosti než čistý P(3HB). Jeho zastoupení v celkové hmotnosti biomasy ale bylo velmi malé oproti tomu, jakou část biomasy představoval P(3HB)

při kultivaci na fruktóze. V získaném kopolymeru bylo také malé množství monomeru, v prvních hodinách kultivace (čas 0h a 4h) byl dokonce zaznamenán polymer tvořený pouze monomery 3HB.

4.4.3 Izolace RNA pro studium exprese genů

RNA bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla získána izolací za použití kitů Macherey-Nagel Plus. Izolace byla provedena z bakteriální kultury kultivované na produkčním minerálním médiu obsahujícím fruktózu nebo γ -butyrolakton jako zdroj uhlíku. Čistota RNA byla ověřena spektrofotometricky a také elektroforeticky na 1,5 % agarózovém gelu.

Výsledné koncentrace, čistota a integrita jednotlivých získaných RNA jsou shrnuty v následujících tabulkách. Tabulka 16 popisuje vzorky RNA z komplexního média, tabulka 17 vzorky RNA získané z kultivací na fruktóze a na γ -butyrolaktonu.

Tabulka 16: Koncentrace a čistota RNA získaných z tekutého kultivačního NB média

vzorek	t [h]	c [$\mu\text{g/ml}$]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
NB4	4	11,6	2,900	0,651
NB8	8	13,2	2,063	0,673
NB16	16	3660	1,635	1,251
NB20	20	4315	1,645	1,710
NB24	24	3363	1,956	1,897
NB32	32	2767	2,107	1,859

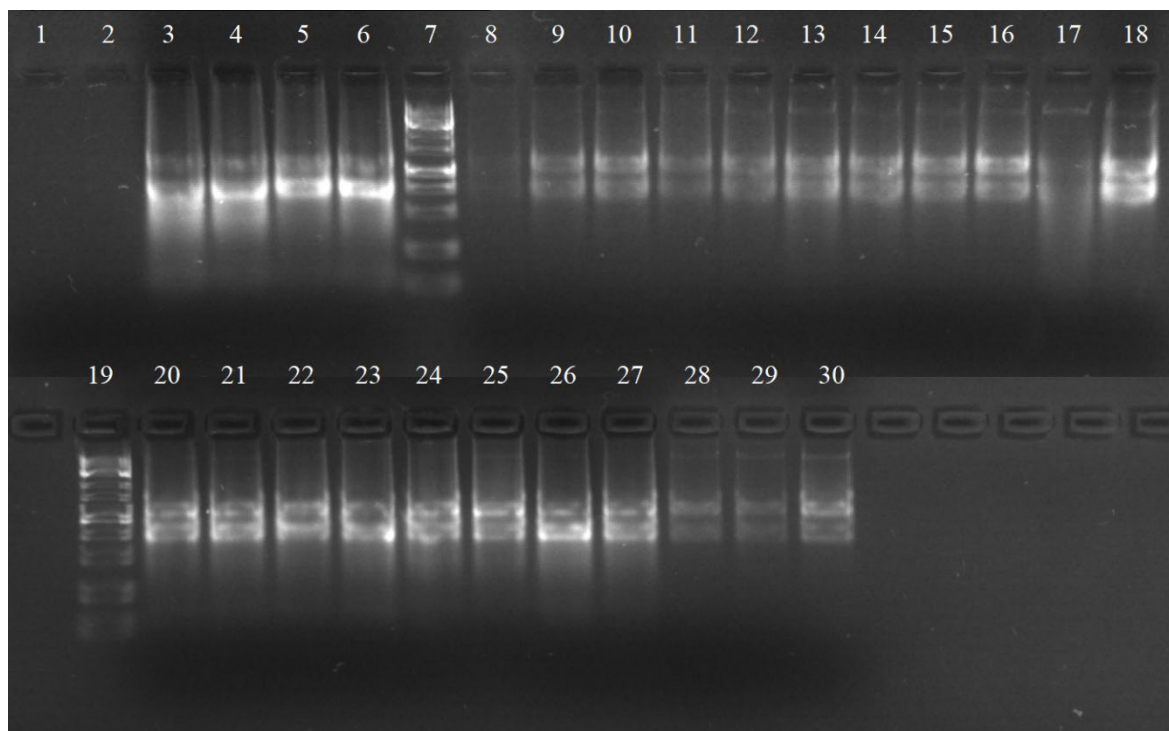
Pro kultivaci na komplexním médiu nebyla RNA izolována na počátku kultivace (čas 0h), jelikož se jednalo o začátek kultivace a bakteriální kultura zde byla v minimální koncentraci. Také v prvních odběrech kultivace (4h a 8h) byla koncentrace buněk velmi nízká, což mělo následně vliv i na koncentraci a kvalitu izolované RNA, protože použitý kit vyžaduje přibližně 30 mg mokré biomasy. Obecně všechny RNA z komplexního média nevykazují příliš stabilní hodnotu poměru absorbancí A_{260}/A_{280} představující čistotu RNA. Hodnota tohoto poměru by se měla pohybovat okolo hodnoty 2,0, k té se vzorky opakovaně přibližují až po přibližně 20h od zahájení kultivace.

Tabulka 17: Koncentrace a čistota RNA získaných z kultivace na fruktóze (označené F) a na γ -butyrolaktonu (označené G)

vzorek	<i>t</i> [h]	<i>c</i> [μg/ml]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	vzorek	<i>t</i> [h]	<i>c</i> [μg/ml]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
F0	0	22,8	1,987	1,110	G0	0	175	2,116	0,561
F4	4	172	2,005	1,227	G4	4	473	2,016	1,231
F8	8	449	1,973	1,761	G8	8	635	2,157	1,196
F12	12	392	2,073	1,699	G12	12	462	1,951	0,656
F16	16	234	2,000	0,954	G16	16	590	2,177	0,741
F20	20	390	2,064	1,914	G20	20	754	2,074	0,938
F24	24	331	2,157	2,327	G24	24	585	2,111	1,427
F36	36	518	2,077	2,038	G36	36	525	2,100	1,717
F48	48	343	2,055	2,095	G48	48	619	2,013	1,122
F60	60	167	1,862	1,311	G60	60	567	2,153	1,446
F72	72	231	2,025	1,407	G72	72	1512	2,042	2,074

Izolace RNA z produkčních médií již byla zdařilejší. Také izolace RNA v počáteční fázi kultivace byla vyhovující, protože byla narostlá již z předchozího kroku (inokulum). Koncentrace získané RNA jsou vysoké, pohybují se v řádech stovek μg/ml. Vyjma vzorků RNA izolovaných z kultivace na γ -butyrolaktonu v časech 0h, 12h, 16h a 20h a vzorku RNA získaného z kultivace na fruktóze v čase 16h byly naměřeny u RNA z produkčních médií vyšší hodnoty poměru absorbancí A₂₆₀/A₂₃₀. Nicméně všechny RNA získané z produkčních médií vykazují poměr absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ okolo hodnoty 2,0, což vylučuje kontaminaci RNA zejména genomickou DNA. Vyšší koncentrace RNA byly obecně naměřeny u RNA získaných z produkčních médií na γ -butyrolaktonu. To je způsobeno větším množstvím vzniklého P(3HB) v produkčních médiích s obsahem fruktózy, kdy obsažený polymer může ztěžovat izolaci RNA ze vzorku.

Všechny získané izolované RNA je taktéž možné vidět na gelu na obrázku 15.



Obrázek 15: Izolovaná RNA získaná z komplexního média a z produkčních médií obsahujících fruktózu a γ -butyrolakton; u značení vzorků NB značí vzorky z komplexního média, F značí vzorky z produkce na fruktóze a G značí vzorky z produkce na γ -butyrolaktonu, číslo za příslušným písmenem pak znázorňuje čas odběru v hodinách

1 – NB4, 2 – NB8, 3 – NB16, 4 – NB20, 5 – NB24, 6 – NB32;

7 – standard pro RNA;

8 – G0, 9 – G4, 10 – G8, 11 – G12, 12 – G16, 13 – G20, 14 – G24, 15 – G36, 16 – G48, 17 – G60, 18 – G72;

19 – standard pro RNA;

20 – F0, 21 – F4, 22 – F8, 23 – F12, 24 – F16, 25 – F20, 26 – F24, 27 – F36, 28 – F48, 29 – F60, 30 – F72

4.4.4 Získ komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkripce pro analýzu exprese genů

Vzorky izolované RNA byly za použití kitu Roche převedeny pomocí reverzní transkripce na cDNA.

Jelikož byla RNA ve většinu případů velmi koncentrovaná, bylo ji nutné pro účely reverzní transkripce ředit. Jednotlivé vzorky byly ředěny 10krát – 100krát. Před zahájením reverzní transkripce byla ještě ověřena úspěšnost izolace RNA a její čistoty na agarózové gelové elektroforéze.

Úspěšnost reverzní transkripce, výsledné koncentrace cDNA a jejich čistotu je možné vidět níže v tabulkách a grafu. Tabulka 18 shrnuje vzorky cDNA z komplexního média, tabulka 19 pak vzorky cDNA získané kultivací na fruktóze a na γ -butyrolaktonu. U téměř všech vzorků získané cDNA byla naměřena podobná koncentrace v řádech tisíců, což potvrdilo dobrou opakovatelnost experimentu při použití kitu Roche na reverzní transkripci RNA.

Tabulka 18: Koncentrace a čistota cDNA získaných z komplexního tekutého kultivačního NB média

vzorek	<i>t</i> [h]	<i>c</i> [μg/ml]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
NB4	4	409	1,437	1,060
NB8	8	374	1,661	1,856
NB16	16	450	1,438	1,259
NB20	20	939	1,652	1,666
NB24	24	1683	1,689	2,013
NB32	32	1688	1,710	1,985

Nižší koncentrace cDNA byla zaznamenána u vzorků odebraných z komplexního média po 4h, 8h a 16h od zahájení kultivace, nicméně u těchto vzorků byly také naměřeny poměrně nízké hodnoty poměru A₂₆₀/A₂₈₀, který představuje čistotu nukleových kyselin a měl by se v případě cDNA pohybovat okolo hodnot 1,7–1,8. Ani při elektroforetickém ověření nebylo možné u vzorků odebraných v čase 4h a 8h pozorovat žádnou RNA již před zahájením reverzní transkripce. Nicméně i přesto byla reverzní transkripce provedena i u těchto vzorků. Nízká koncentrace získané cDNA v těchto vzorcích proto nebyla pravděpodobně způsobena kitem, ale kvalitou vstupní RNA.

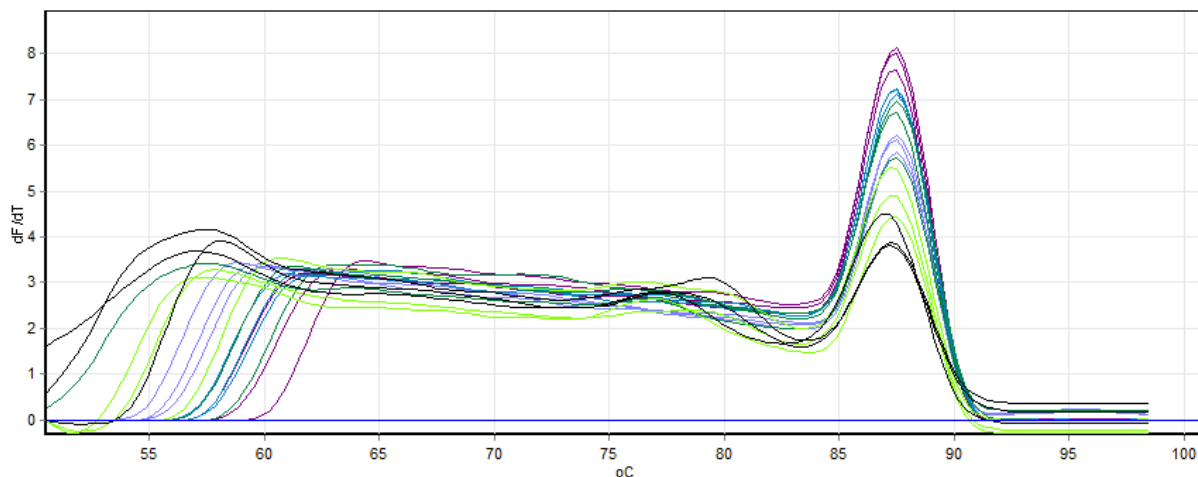
Tabulka 19: Koncentrace a čistota cDNA získaných z kultivace na fruktóze (označené F) a na γ-butyrolaktonu (označené G)

vzorek	<i>t</i> [h]	<i>c</i> [μg/ml]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	vzorek	<i>t</i> [h]	<i>c</i> [μg/ml]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
F0	0	2003	1,727	1,996	G0	0	1841	1,694	1,875
F4	4	1553	1,769	1,789	G4	4	1738	1,687	1,908
F8	8	1829	1,711	1,977	G8	8	1987	1,737	1,837
F12	12	1592	1,705	1,865	G12	12	1813	1,687	1,843
F16	16	1674	1,683	1,860	G16	16	1688	1,698	1,818
F20	20	1800	1,648	1,895	G20	20	1756	1,690	1,855
F24	24	1862	1,731	1,870	G24	24	1912	1,701	1,783
F36	36	1645	1,71	1,919	G36	36	1937	1,694	1,833
F48	48	1807	1,731	1,946	G48	48	1996	1,672	1,842
F60	60	1930	1,717	1,904	G60	60	2021	1,764	1,759
F72	72	1845	1,659	1,794	G72	72	2366	1,679	1,876

4.4.5 Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR

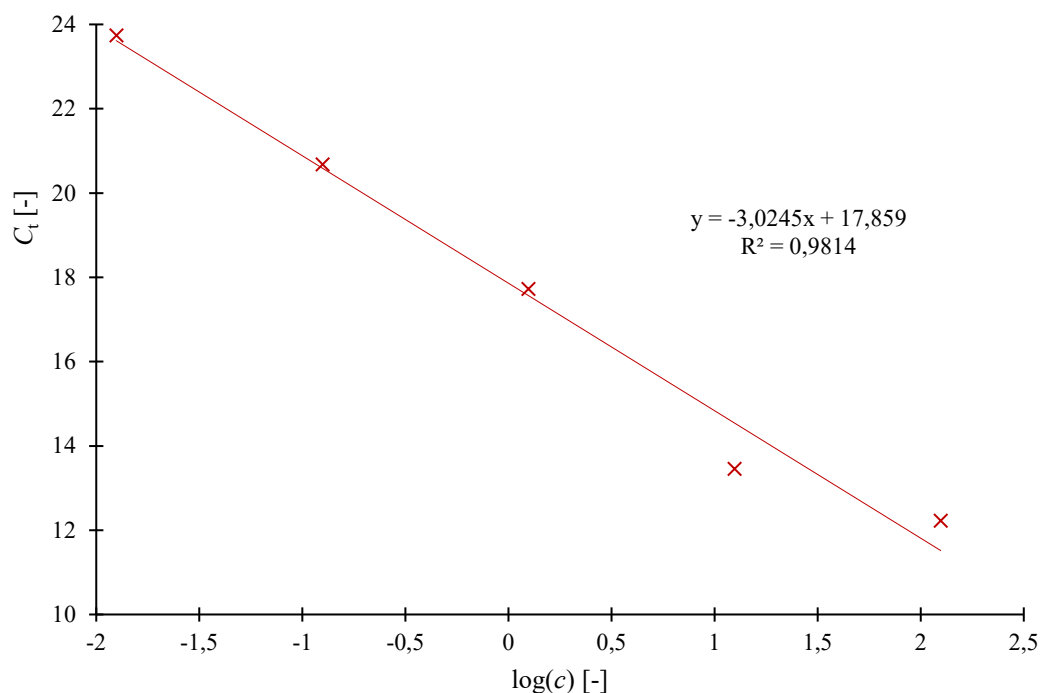
Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR u bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla provedena u vzorků bakteriální kultury získané z kultivace na produkčním médiu obsahujícím fruktózu, γ-butyrolakton a z kultivace na komplexním médiu. Při kvantitativní PCR byly během každého cyklu vznikající syntetizované amplikony genů zaznamenány díky fluorescenčnímu interkalačnímu barvivu SYTO9, obsaženému v qPCR 2x SYTO-9 Master Mix. Toto barvivo se váže do struktury syntetizované DNA a díky tomu je možné zaznamenat fluorescenční signál a tím pak úspěšnost amplifikace. Zvyšující se odezva v podobě fluorescenčního signálu je přímo úměrná množství vzniklých amplikonů DNA v analyzovaném vzorku [51].

Téměř všechny křivky tání analyzovaných genů zahrnovaly jenom specifickou amplifikaci, měly jednotný vrchol píku křivky tání, čímž vypovídají o jednotné velikosti daného amplikonu. Příklad křivek tání kalibrační křivky housekeeping genu kódující produkt 16S rRNA zaznamenané pomocí software přístroje real-time PCR cykler Rotor-Gene™ 6000 znázorňuje obrázek 16.



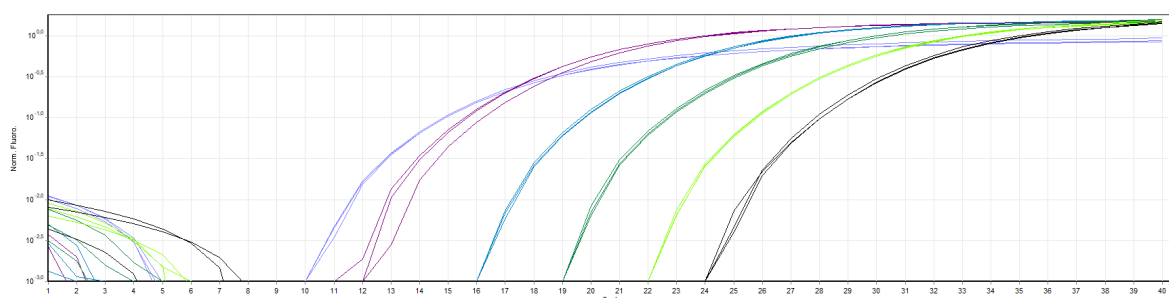
Obrázek 16: Křivky tání housekeeping genu kódujícího produkt 16S rRNA, zaznamenané pomocí přístroje real-time PCR cykler Rotor-Gene™ 6000

K amplifikaci vybraných úseků DNA byly použity celkem čtyři primery popsané v předchozích kapitolách. Pro každý použitý gen byla také provedena kalibrace, k níž byla použita izolovaná genomická DNA, izolovaná za použití kitu Monarch. Pomocí kalibrace byla získána rovnice kalibrační přímky, díky níž byla vypočítána koncentrace konkrétních genů. Příklad kalibrační přímky a její rovnice je zobrazen na obrázku 17, konkrétně pro housekeeping gen kódující produkt 16S. Genová exprese byla následně také vypočítána a relativně kvantifikována pomocí Livakovy metody, která využívá pro výpočet hodnotu C_t , a porovnána pro jednotlivé geny a mezi uhlíkovými substráty.



Obrázek 17: Kalibrační přímka pro housekeeping gen 16S

Následující obrázek 18 zobrazuje kalibrační křivky pro stejný gen, zaznamenané pomocí software k použitému real-time PCR cykler Rotor-Gene™ 6000 přístroji.



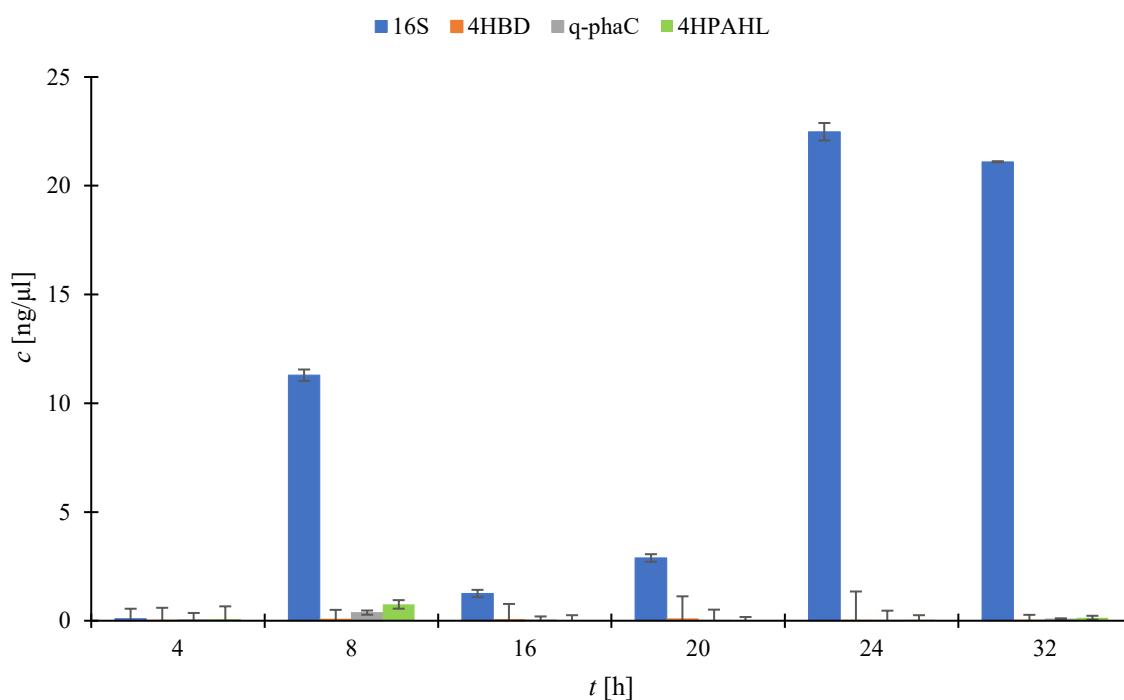
Obrázek 18: Záznam jednotlivých amplifikačních křivek standardů genomické DNA pro kalibraci pomocí RT-qPCR; křivka vykreslena přístrojem real-time PCR cykler Rotor-Gene™ 6000

Získané amplifikační křivky jednotlivých genů vykazovaly pro vzorky získané z různých uhlíkových substrátů různou úroveň amplifikace. Hodnoty C_t (cycle threshold) neboli hodnota odpovídající cyklu, ve kterém se intenzita fluorescence dostane nad prahovou hodnotu [51], byly pro housekeeping gen zaznamenány v rozmezí 11–13. Pro ostatní geny se hodnoty C_t pohybovaly pro jednotlivé vzorky cDNA v rozmezí 18–26. Toto rozmezí je poměrně široké a vypovídá o velkém vlivu počáteční koncentrace cDNA na úspěšnost amplifikace, zejména u housekeeping genu, kdy by měla být úroveň amplifikace stále stejná, nehledě na kultivační nebo jakékoli jiné podmínky. Různá vstupní koncentrace cDNA tak snižuje opakovatelnost a relevantnost experimentu. To by mohlo být vylepšeno naředěním všech analyzovaných vzorků cDNA na naprosto přesně stejnou koncentraci anebo přidáním takového objemu do reakční PCR směsi, aby koncentrace cDNA v této směsi byla pro všechny vzorky stejná. Nicméně bylo postupováno podle návodu ke kitu Roche, jehož návod doporučuje přidávat vždy 1 μ l cDNA získané reverzní transkripcí RNA. Navíc i přes poměrně vysoké vstupní koncentrace cDNA

(s výjimkou několika vzorků získaných z komplexního média) bylo kromě housekeeping genu dosaženo ve většině případů poměrně vysoké hodnoty C_t . To vypovídá o nízké koncentraci cDNA na počátku reakce. Znamená to, že ani koncentrace templátu cDNA v řádech tisíců nebyla dostačující. Dalšími kroky pro zvýšení úspěšnosti experimentu by tak mohlo být zvýšení koncentrace cDNA v PCR směsi.

Následující grafy zobrazují koncentraci jednotlivých genů na různých uhlíkových substrátech, čímž je také demonstrována úspěšnost amplifikace.

Na obrázku 19 je znázorněna koncentrace amplikonů jednotlivých genů pro vzorky získané z kultivace na komplexním médiu.



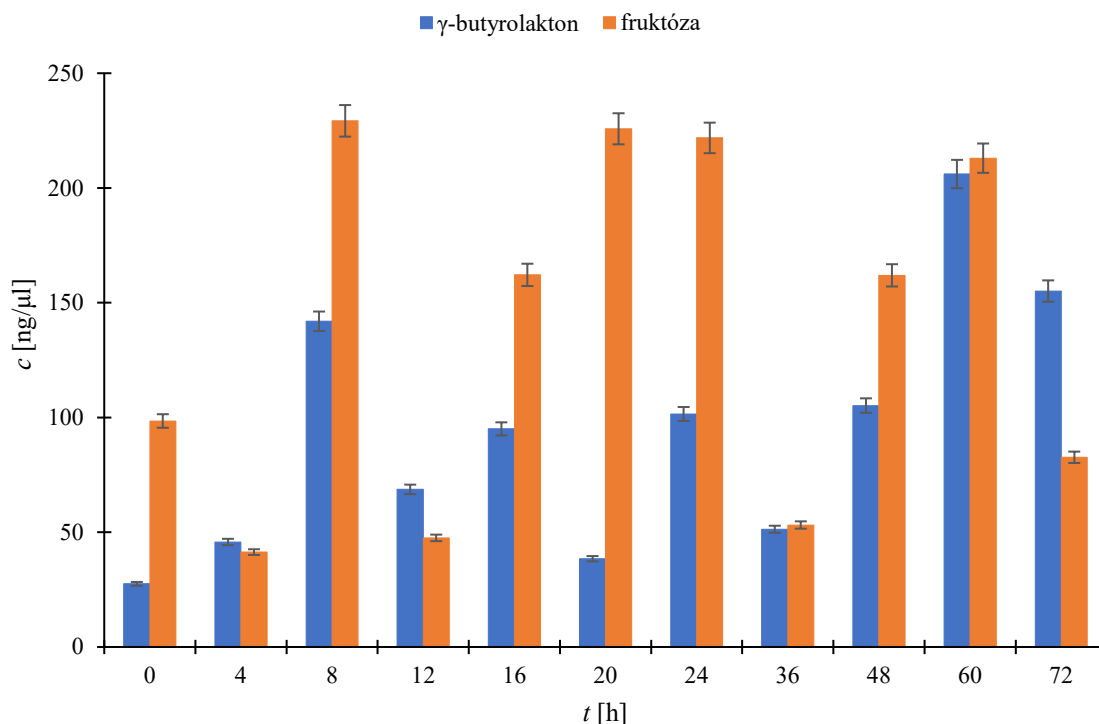
Obrázek 19: Koncentrace jednotlivých genů během kultivace na komplexním médiu

V případě amplifikace cDNA získané ze vzorků z komplexního média měla počáteční koncentrace templátu cDNA nejvýznamnější vliv na expresi housekeeping genu, jelikož v prvních hodinách kultivace bylo dosaženo nízkých koncentrací cDNA, což vedlo k signifikantně rozdílným výsledkům amplifikace. Nicméně i přes to byla koncentrace tohoto genu v čase 8h poměrně vysoká oproti dalším časům kultivace. Také pro ostatní analyzované geny byla v tomto čase pozorována jejich vyšší koncentrace v porovnání s ostatními časy. V těchto časech byl i zaznamenán zásadní pokles exprese všech genů oproti housekeeping genu. Nejvýraznější rozdíly byly sledovány v čase 24h, kdy poklesla exprese ostatních genů oproti housekeeping genu dokonce stonásobně více.

Pro vzorky z tohoto média není možné sledovat a porovnat souvislost exprese genů s produkcí PHA, jelikož bakterie *Cupriavidus necator* H16 sice produkuje PHA i na komplexním médiu, ale mnohem méně než na produkčním minerálním médiu, na kterém byla bakterie kultivována

dále. Z těchto důvodů nebyla gravimetricky stanovena biomasa ani stanoven obsah PHA pomocí GC-FID.

Na obrázku 20 je zaznamenána koncentrace amplikonů housekeeping genu pro cDNA získané z bakteriální kultury kultivované na fruktóze a na γ -butyrolaktonu.

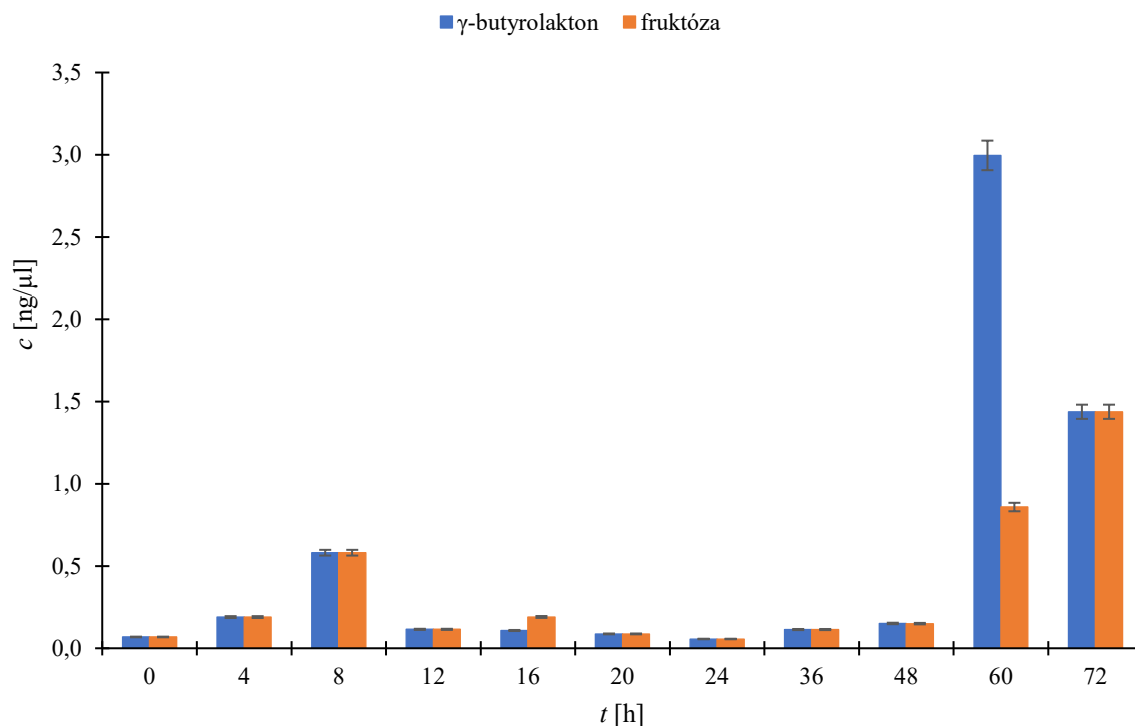


Obrázek 20: Koncentrace housekeeping genu kódujícího produkt 16S při kultivaci na fruktóze a γ -butyrolaktonu

Taktéž v případě kultivace na produkčních médiích byly zaznamenány rozdílné amplifikace pro jednotlivé substráty, a dokonce mezi časy kultivace, přestože se jednalo o housekeeping gen. Přestože se vstupní koncentrace cDNA pohybovaly vždy pro všechny vzorky v řádech tisíců na velmi podobných hodnotách a pro získanou cDNA byla stanovena uspokojivá hodnota čistoty pomocí poměru absorbancí A_{260}/A_{280} , výsledné koncentrace genu byly pro oba substráty rozdílné. Nicméně i přes veliké rozdíly mezi jednotlivými vzorky byla oproti ostatním genům koncentrace housekeeping genu velmi vysoká. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že exprese tohoto genu nezávisí na čase nebo množství či druhu uhlíkatého substrátu jako exprese jiných genů. Naopak pro tyto ostatní geny lze pozorovat korelaci jejich nízké koncentrace s nízkými výtěžky PHA.

Pro úspěšnější výsledky RT-qPCR by mohly být kromě genu kódujícího produkt 16S rRNA jako housekeeping gen použit ještě jiný housekeeping gen. Jako tento housekeeping gen by bylo možné použít gen kódující β podjednotku enzymu DNA gyrázy (Gyr-B) anebo gen kódující σ podjednotku RNA polymerázy (RpoD). Tyto geny byly použity v diplomové práci Elišky Kubáckové [45], nicméně v této práci použity nebyly právě na základě výsledků zmíněné diplomové práce. Při jejich použití bylo totiž taktéž dosaženo nízké úrovně amplifikace a byla by tak nutná další optimalizace.

Na obrázku 21 je zaznamenána koncentrace genu kódujícího produkt 4HBD pro cDNA získané z bakteriální kultury kultivované na fruktóze a na γ -butyrolaktonu.

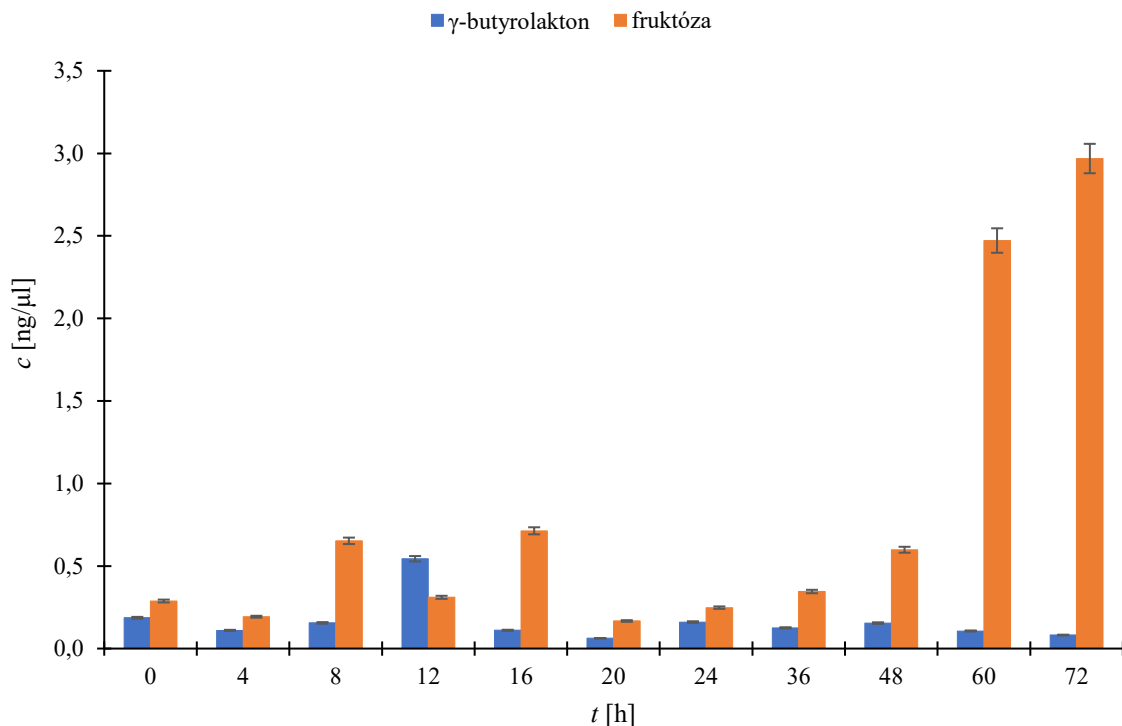


Obrázek 21: Koncentrace genu kódujícího produkt 4HBD při kultivaci na fruktóze a γ -butyrolaktonu

Přestože u tohoto genu měla být zaznamenána vysoká koncentrace a úroveň exprese zejména pro vzorky z kultivace na γ -butyrolaktonu, nebyly pozorovány významně vysoké koncentrace tohoto genu a ani rozdíly oproti vzorkům z kultivace na fruktóze. Nicméně pro tento gen byla zaznamenána hodnota C_t u negativní kontroly velmi blízko hodnotám C_t analyzovaných vzorků. Přesto ale lze pozorovat mírné zvýšení koncentrace genu v případě cDNA získané z fruktózy i γ -butyrolaktonu v čase 8h a rovněž výrazný nárůst mezi časy 48h a 60h, zejména v případě γ -butyrolaktonu. Housekeeping gen byl ve všech případech přepisován výrazně více než tento gen kódující 4HBD, ale i tak je možné pozorovat zajímavé rozdíly v expresi v závislosti na uhlíkovém substrátu, stejně jako v případě koncentrace. Nejvýznamnější jsou tyto rozdíly opět v čase 60h. Housekeeping gen je při kultivaci na fruktóze oproti genu kódujícímu produkt 4HBD přepisován až téměř třikrát více, než je přepisován oproti tomu samému genu na γ -butyrolaktonu.

V tomto případě lze pozorovat souvislost rovněž s výtěžky kopolymeru P(3HB-co-4HB) z kultivace na γ -butyrolaktonu. V čase 60h bylo pozorováno zvýšení koncentrace tohoto kopolymeru ve vzorku a od času 48h také zvýšení zastoupení monomeru 4HB v získaném kopolymeru. V případě kultivace na fruktóze se od času 48h mírně zvýšila koncentrace genu a k takovému zvýšení dochází i v případě výtěžku získaného P(3HB) z této kultivace.

Na obrázku 22 je možné vidět koncentrace genu kódujícího PHA syntázu (PhaC) bakterie *Cupriavidus necator* H16 pro cDNA získané z bakteriální kultury kultivované na fruktóze a na γ -butyrolaktonu.

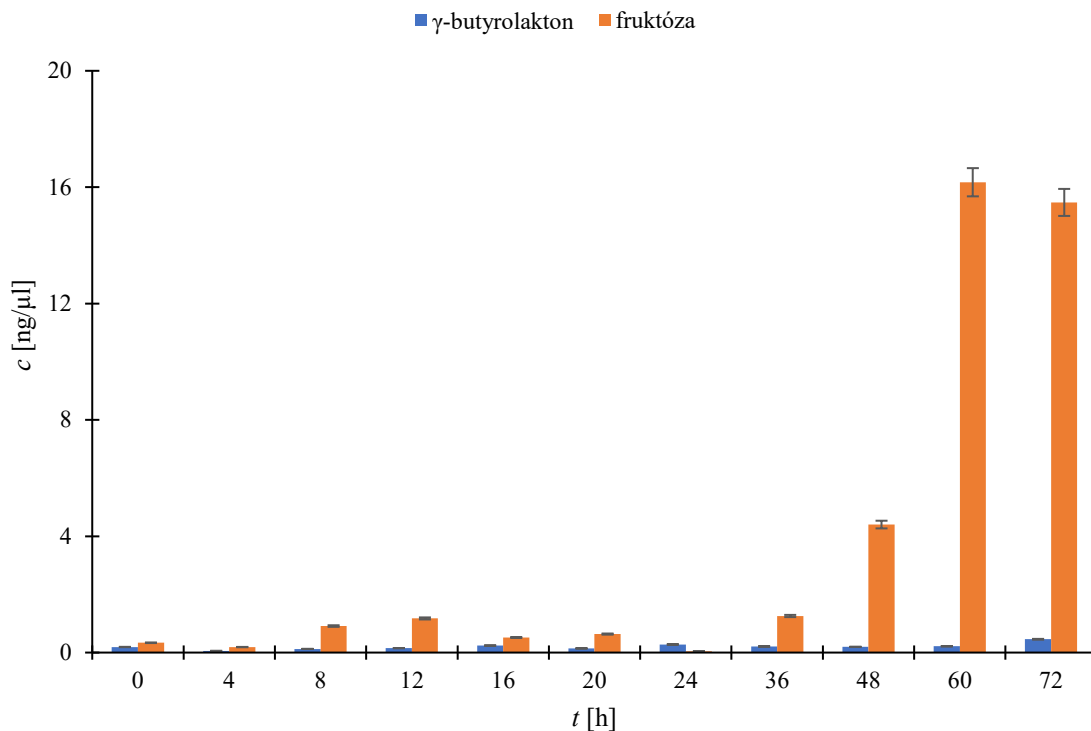


Obrázek 22: Koncentrace genu kódujícího PHA syntázu (PhaC) při kultivaci na fruktóze a γ -butyrolaktonu

Ačkoli koncentrace genu kódujícího PHA syntázu (PhaC) nedosahovala velmi vysokých hodnot, podobně jako u ostatních genů vyjma housekeeping genu, byly zaznamenány zajímavé rozdíly mezi kultivacemi na fruktóze a na γ -butyrolaktonu. K mírným změnám v koncentraci genu pro jednotlivé substráty dochází v časech 8h, 12h a 16h, kdy koncentrace genu pro vzorky na fruktóze mírně roste v čase 8h a 16h, kdežto pro γ -butyrolaktonu naopak roste v čase 12h. Nicméně se nejedná o vysoké koncentrace ani v jednom případě, koncentrace se stále pohybuje okolo hodnoty 0,5 ng/μl, a proto toto nejsou tak významné změny.

Výraznější rozdíly v koncentraci byly zaznamenány v pozdějších hodinách kultivace, kdy koncentrace genu u vzorků z kultivace na γ -butyrolaktonu se v čase téměř vůbec nemění, kdežto u vzorků z kultivace na fruktóze je možné sledovat nárůst koncentrace genu, nejvýznamnější mezi časy 48h a 60h. V tomto případě lze pozorovat jistou korelaci i s OD, které se u γ -butyrolaktonu v čase téměř nemění, kdežto u fruktózy se postupně zvyšuje až do posledního odběru v čase 72h. Signifikantní rozdíly byly zaznamenány i při expresi genů, kdy byl housekeeping gen na fruktóze v čase 60h a 72h oproti genu kódujícímu PHA syntázu PhaC přepisován přibližně patnáctkrát méně, než byl v těch stejných časech oproti genu kódujícímu PHA syntázu PhaC na γ -butyrolaktonu.

Na obrázku 23 je zaznamenána koncentrace genu kódujícího produkt 4HPAHL pro cDNA získané z bakteriální kultury kultivované na fruktóze a na γ -butyrolaktonu.



Obrázek 23: Koncentrace genu kódujícího produkt 4HPAHL při kultivaci na fruktóze a γ -butyrolaktonu

V případě genu kódujícího produkt 4HPAHL byly, podobně jako u ostatních genů, zaznamenány rozdíly v koncentraci genu mezi uhlíkatými substráty zejména v pozdějších hodinách kultivace. Sice došlo k mírnému nárůstu koncentrace genu v čase 8h a 12h při kultivaci na fruktóze, ale v dalších hodinách koncentrace opět poklesla a poté se držela na velmi podobných hodnotách až do času 36h, k nejvýraznějšímu nárůstu koncentrace genu na tomto zdroji uhlíku dochází mezi časy 48h a 60h. Oproti tomu na γ -butyrolaktonu se koncentrace genu drží po celou dobu kultivace na velmi nízkých hodnotách. Tyto rozdíly je možné pozorovat i při expresi genů, kdy housekeeping gen je od času 36h přepisován oproti genu kódujícímu produkt 4HPAHL na fruktóze méně než dvacetkrát více a postupně se rozdíl zmenšuje, kdežto pro γ -butyrolakton byly zaznamenány pro stejné geny rozdíly v řádu stovek. V časech 60h a 72h je housekeeping gen na γ -butyrolaktonu oproti genu kódujícímu produkt 4HPAHL přepisován až šedesátkrát více než housekeeping gen na fruktóze oproti genu kódujícímu produkt 4HPAHL.

Z výše popsaných výsledků je patrné, že genová exprese je do značné míry ovlivněna typem a množstvím uhlíkatého substrátu, který je přidán do produkčního média (vyjma housekeeping genu). Exprese se taktéž mění v závislosti na produkovaném biopolymeru, např. gen kódující 4HBD při kultivaci bakterie na γ -butyrolaktonu. Ve vzniklém kopolymeru je totiž zastoupen i monomer 4HB a exprese se zvyšuje s procentuálním zastoupením tohoto monomeru v biopolymeru. Naopak vysoké koncentrace genu kódujícího PHA syntázu (PhaC) při kultivaci na fruktóze korelují s vyššími výtěžky PHA oproti kultivaci na γ -butyrolaktonu. Nicméně výsledné koncentrace všech těchto genů jsou poměrně nízké. V dalších měřeních by tomuto mohlo být předejito např. optimalizací podmínek RT-qPCR nebo množstvím uhlíkatého substrátu v produkčním médiu.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala studiem genové exprese bakterie *Cupriavidus necator* H16. První část práce představovala optimalizace RT-qPCR metodiky pro účely studia exprese genů této bakterie. Vybrané geny kódují enzymy zapojené do metabolismu PHA. Optimalizace zahrnovala taktéž porovnání a následný výběr nejvhodnějšího komerčního kitu na izolaci genomické DNA, izolaci RNA a reverzní transkripci RNA. Druhá část práce se zabývala samotnou implementací optimalizované RT-qPCR metody na bakteriální kultury kultivované za různých podmínek.

Pro studium exprese genů byly nejprve optimalizovány podmínky kvantitativní PCR pro vybrané geny. U všech použitých primerů byla optimalizována doba a teplota annealingu, aby bylo dosaženo co nejvyšší intenzity fluorescence. Při porovnání komerčních kitů bylo zjištěno, že použitý kit ovlivňuje kvalitu i kvantitu získaných nukleových kyselin, které jsou nezbytné pro studium exprese genů. Z izolačních kitů pro izolaci genomické DNA byl nejlepší kit Monarch, jelikož získaná genomická DNA měla vysokou koncentraci i čistotu. Mezi izolačními kity pro izolaci RNA byl jako nejlepší zvolen kit Macherey-Nagel Plus, protože izolovaná RNA dosahovala vysokých hodnot koncentrace, čistoty i integrity. Dalším důležitým krokem byl převod RNA do cDNA pomocí reverzní transkripce. Pro tento krok byly porovnávány celkem tři kity, z nichž nejvyšších výtěžků a kvality získané cDNA bylo dosaženo pro kit Roche.

Ve druhé části práce byly poznatky z optimalizační části využity na studium exprese vybraných genů za účelem porovnání produkce PHA na dvou různých uhlíkatých substrátech, kterými byla fruktóza a γ -butyrolakton. Kromě genové exprese byla také sledována optická hustota buněk, koncentrace biomasy a množství PHA. Byl zjištěn významný vliv uhlíkatého substrátu na expresi konkrétního genu. Exprese genu kódujícího PHA syntázu byla mnohonásobně větší při kultivaci na fruktóze než na γ -butyrolaktonu, stejně tomu bylo i v případě genu kódujícího produkt 4HPAHL. Naopak u genu kódujícího produkt 4HBD byla zaznamenána vyšší exprese při kultivaci na γ -butyrolaktonu než při kultivaci na fruktóze.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SINDHU, Raveendran, Aravind MADHAVAN, K.B. ARUN, et al., 2021. Metabolic circuits and gene regulators in polyhydroxyalkanoate producing organisms: Intervention strategies for enhanced production. *Bioresource Technology* [online]. 327 [cit. 2021-5-12]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791
- [2] KRANZ, R G, K K GABBERT, T A LOCKE a M T MADIGAN, 1997. Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. *Applied and environmental microbiology* [online]. 63(8), 3003-3009 [cit. 2021-5-12]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.63.8.3003-3009.1997
- [3] REHM, Bernd H.A., Niels KRÜGER a Alexander STEINBÜCHEL, 1998. A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 273(37), 24044-24051 [cit. 2021-5-12]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.37.24044
- [4] ZINN, M. a R. HANY, 2005. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials* [online]. 7(5), 408-411 [cit. 2021-5-11]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053
- [5] RUDNIK, Ewa, 2019. *Compostable Polymer Materials*. 2nd edition. Elsevier. ISBN 9780080994383.
- [6] Kourilova, X. et al., 2021. KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA, 2021. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* [online]. 325 [cit. 2021-5-12]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [7] ZINN, Manfred, Bernard WITHOLT a Thomas EGLI, 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 53(1), 5-21 [cit. 2021-5-12]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00218-6
- [8] Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes)_, 2009. *Journal of Bacteriology* [online]. 8 [cit. 2021-11-09]. Dostupné z: <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1128%2Fjb.01723-08&token=WzMyNDUxNTYsIjEwLjExMjgvaWJwMDE3MjMtMDgiXQ.dnTY1bhVn1FcYCtHR-6lUwIJwTA>
- [9] KUMAR, Manish, Rashmi RATHOUR, Rashmi SINGH, et al., 2020. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production* [online]. 263 [cit. 2022-01-13]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2020.121500

- [10] CIESIELSKI, Slawomir, Justyna MOŽEJKO a Nipon PISUTPAISAL, 2015. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* [online]. 106, 408-421 [cit. 2022-01-13]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.09.040
- [11] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA, 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 36(3), 856-870 [cit. 2022-01-13]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [12] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel Miranda DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG, 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology* [online]. 37, 24-38 [cit. 2022-01-13]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.001
- [13] SUDESH, K, H ABE a Y DOI, 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 25(10), 1503-1555 [cit. 2021-11-09]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [14] TSUGE, Takeharu, Manami HYAKUTAKE a Kouhei MIZUNO, 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 99(15), 6231-6240 [cit. 2021-11-09]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6777-9
- [15] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ, 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* [online]. 192, 271-282 [cit. 2021-11-09]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- [16] MEZZOLLA, Valeria, Oscar D'URSO a Palmiro POLTRONIERI, 2018. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers* [online]. 10(8), 12 [cit. 2021-11-09]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10080910
- [17] STEINBÜCHEL, Alexander a Tina LÜTKE-EVERSLOH, 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 16(2), 81-96 [cit. 2021-11-09]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00036-6
- [18] HONG, S.H. a S.Y. LEE, S.J. PARK, ed. Polymerization of Building Blocks to Macromolecules: Polyhydroxyalkanoates as an Example. SMOLKE, Christina. The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals. 1st Edition. USA: CRC Press, 2009, 4.1-4.20. ISBN 9781439802960.
- [19] KIM, Jieun, Yeo-Jin KIM, So Young CHOI, Sang Yup LEE a Kyung-Jin KIM, 2017. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal* [online]. 12(1) [cit. 2022-03-12]. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201600648

- [20] CHEK, Min Fey, Sun-Yong KIM, Tomoyuki MORI, Hasni ARSAD, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA, 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. 7(1) [cit. 2022-03-12]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05509-4
- [21] MADISON, Lara L. a Gjalt W. HUISMAN, 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 63(1), 21-53 [cit. 2021-11-09]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999
- [22] ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN, 2017. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 101(20), 7417-7426 [cit. 2022-01-13]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8485-0
- [23] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL, 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 25(1-3), 3-19 [cit. 2022-01-13]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [24] MIZUNO, Kouhei, Aya OHTA, Manami HYAKUTAKE, Yousuke ICHINOMIYA a Takeharu TSUGE, 2010. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 95(8), 1335-1339 [cit. 2022-01-14]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.033
- [25] MOHAPATRA, Swati, Sudipta MAITY, Hirak Ranjan DASH, Surajit DAS, Swati PATTNAIK, Chandi Charan RATH a Deviprasad SAMANTARAY, 2017. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 12, 206-213 [cit. 2022-01-14]. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2017.10.001
- [26] REHM, Bernd H. A., 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. 376(1), 15-33 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj20031254
- [27] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM, 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 89, 161-174 [cit. 2022-01-14]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [28] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA, 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 87(2), 137-146 [cit. 2022-01-14]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2

- [29] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK, 2002. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* [online]. 56(1), 403-432 [cit. 2022-03-09]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- [30] MARTÍNEZ-AVILA, Oscar, Jordi LLIMÓS a Sergio PONSÁ, 2021. Integrated solid-state enzymatic hydrolysis and solid-state fermentation for producing sustainable polyhydroxyalkanoates from low-cost agro-industrial residues. *Food and Bioprocess Processing* [online]. 126, 334-344 [cit. 2022-02-03]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2021.01.015
- [31] KOVALCIK, Adriana, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Martin SZOTKOWSKI, Vojtech ENEV, Michal KALINA a Ivana MAROVA, 2020. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food and Bioprocess Processing* [online]. 124, 1-10 [cit. 2022-02-03]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2020.08.003
- [32] KOVALCIK, Adriana, Dan KUCERA, Petra MATOUSKOVA, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Michal KALINA, Vojtěch ENEV a Ivana MAROVA, 2018. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 6(2), 3495-3501 [cit. 2022-02-03]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2018.05.028
- [33] MOHAN, Ganesh, Robert Lee JOHNSON a Jian YU, 2021. Conversion of Pine Sawdust into Polyhydroxyalkanoate Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 9(25), 8383-8392 [cit. 2022-02-04]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.1c00009
- [34] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK, et al., 2016. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 363(10) [cit. 2022-03-07]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnw094
- [35] FUKUI, T a Y DOI, 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of bacteriology* [online]. 179(15), 4821-4830 [cit. 2021-5-12]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.179.15.4821-4830.
- [36] ALAMGEER, Mohammad, 2019. Polyhydroxyalkanoates (PHA) genes Database. *Bioinformation* [online]. 15(1), 36-39 [cit. 2021-5-22]. ISSN 09738894. Dostupné z: doi:10.6026/97320630015036
- [37] JUENGERT, Janina R., Cameron PATTERSON, Dieter JENDROSSEK a Maia KIVISAAR, 2018. Poly(3-Hydroxybutyrate) (P(3HB)) Polymerase PhaC1 and P(3HB) Depolymerase PhaZa1 of *Ralstonia eutropha* Are Phosphorylated In Vivo. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 84(13) [cit. 2022-01-20]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00604-18

- [38] MAESTRO, Beatriz a Jesús M. SANZ, 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* [online]. 10(6), 1323-1337 [cit. 2022-01-20]. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12718
- [39] PFEIFFER, Daniel a Dieter JENDROSSEK, 2014. PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (P(3HB)) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 80(2), 555-563 [cit. 2022-01-20]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02935-13
- [40] FITZGERALD-HAYES, Molly a Frieda REICHSMAN, c2010. *DNA and biotechnology*. 3rd ed. Burlington, MA: Academic Press/Elsevier. ISBN 978-0-12-048930-5.
- [41] KOČÁREK, Eduard, 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-36-4.
- [42] NAIRN, Alison V., Mitche DELA ROSA a Kelley W. MOREMEN, 2010. Transcript Analysis of Stem Cells. *Functional Glycomics* [online]. Elsevier, 2010, s. 73-91 [cit. 2022-03-12]. Methods in Enzymology. ISBN 9780123809971. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(10)79004-2
- [43] KOLLER, Martin a Alejandra RODRÍGUEZ-CONTRERAS, 2015. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* [online]. 15(6), 558-581 [cit. 2022-03-12]. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201400228
- [44] CASELLA, Sergio, Lorenzo FAVARO a Marina BASAGLIA, 2016. Bacterial Genetic Modifications for Improving Polyhydroxyalkanoates Production from Inexpensive Carbon Sources. KOLLER, Martin, ed. *Recent Advances in Biotechnology* [online]. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2016-09-29, s. 380-435 [cit. 2022-03-12]. ISBN 9781681083254. Dostupné z: doi:10.2174/9781681083254116010010
- [45] KUBÁČKOVÁ, Eliška. Molekulárně biologická charakterizace vybraných producentů PHA [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-28]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/122773>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.
- [46] ARRAIANO, Cecília M., José M. ANDRADE, Susana DOMINGUES, et al., 2010. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 34(5), 883-923 [cit. 2022-04-19]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00242.x
- [47] Spektrofotometrické vyhodnocení nukleových kyselin. *LabGuide.cz: Metody* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/spektrofotometricke-vyhodnoceni-nukleovych-kyselin/>

- [48] 2-MERCAPTOETHANOL. *Material Safety Data Sheet* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://hazard.com/msds/mf/baker/baker/files/m1209.htm>
- [49] Polymerázová řetězová reakce. *BIOGEN: Molekulární biologie a genetika* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>
- [50] FUKUI, Toshiaki, Kenta CHOU, Kazuo HARADA, Izumi ORITA, Yasumune NAKAYAMA, Takeshi BAMBA, Satoshi NAKAMURA a Eiichiro FUKUSAKI, 2014. Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16. *Metabolomics* [online]. **10**(2), 190-202 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1573-3882. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-013-0567-0
- [51] MCPHERSON, Michael J. a Simon Geir MøLLER. PCR [online]. 2nd. Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 0-203-00267-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=NSSFjn2-SuUC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHA	polyhydroxyalkanoát
3HB	3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (short-chain-length)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce (medium-chain-length)
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem (long-chain-length)
4HBD-F	přední (forward) primer pro 4-hydroxybutyrát dehydrogenázu
4HBD-R	zadní (reverse) primer pro 4-hydroxybutyrát dehydrogenázu
4HD3DL-F	přední (forward) primer pro 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu
4HD3DL-R	zadní (reverse) primer pro 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu
4HPAHL-F	přední (forward) primer pro 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu
4HPAHL-R	zadní (reverse) primer pro 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylázu
Gyr-B	β podjednotka DNA gyrázy
RpoD	σ podjednotka RNA polymerázy
bp	pár bazí (base pair)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GAP	proteiny asociované s granulemi (granule-associated protein)
GC-FID	plynová chromatografie s plamenovou detekcí (gas chromatography with flame ionization detection)
NO-RT	roztok bez reverzní transkriptázy
PCR	polymerázová řetězová reakce
phaC-F	přední (forward) primer pro PHA syntázu
phaC-R	zadní (reverse) primer pro PHA syntázu
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
RT-PCR	reverzní transkripce - polymerázové řetězové reakce
RT-qPCR	reverzní transkripce - kvantitativní polymerázové řetězové reakce
q16S-F	přední (forward) primer pro 16S rRNA
q16S-R	zadní (reverse) primer pro 16S rRNA
TBE pufr	Tris-borát-EDTA pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr