



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH TECHNIK PŘI STUDIU TERMOFILNÍCH MIKROORGANISMŮ

USE OF MOLECULAR TECHNIQUES FOR STUDY OF THERMOPHILLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dominika Dvořáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1906/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Dominika Dvořáková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití molekulárních technik při studiu termofilních mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše na téma využití metabolismus PHA u extrémofilních mikroorganismů a jeho studium s využitím molekulárních technik
- Zavedení a optimalizace izolace DNA a RNA z termofilních kultur *Aneurinibacillus* sp.
- Amplifikace vybraných úseků pomocí konvenční i kvantitativní PCR
- Využití RT-qPCR ke studiu exprese vybraných genů zapojených do syntézy PHA

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Dominika Dvořáková
studentka

Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Polyhydroxyalkanoáty jsou mikrobiální zásobní polymery představující ekologickou alternativu k petrochemickým plastům. Vysoká produkční cena však brání jejich širšímu uplatnění na trhu. Využití odpadních látek jako substrátu a/nebo produkce pomocí extremofilních organismů mohou ovšem výrobní náklady snížit. Rod termofilních bakterií *Aneurinibacillus* je jedním z potenciálních předmětů zájmu v této oblasti zejména díky schopnosti produkce široké palety netradičních kopolymerů. Zajímavá je i nezávislost syntézy PHA na limitaci živinami, jejíž studium se stalo jedním z hlavních cílů této práce především se zaměřením na expresi genů zapojených do syntézy PHA. Konkrétně byl studován kmen *Aneurinibacillus sp.* AFn2 na různých typech produkčních médií. Přítomnost vybraných genů byla ověřena pomocí klasické PCR. Následně byly provedeny kultivační experimenty na minerálním a komplexním médiu simulující prostředí s různou dostupností živin. V průběhu měření růstové křivky na obou médiích byla ze vzorků odebíraných v různých časech gravimetricky stanovována koncentrace biomasy a současně s pomocí plynové chromatografie i obsah PHA. Na závěr byla analyzována exprese studovaných genů pomocí RT-qPCR, která odhalila výrazné odlišnosti transkripce jednotlivých genů v závislosti na typu média a na čase kultivace. Výsledky potvrdily, že schopnost produkce PHA u *Aneurinibacillus sp.* AFn2 není závislá na limitaci živinami, ovšem míra zaplnění buněk produkovaným polymerem s typem média souvisí. Příčinou je pravděpodobně rozdílný průběh exprese genů zapojených do syntézy PHA. Na komplexním médiu bylo pozorováno vyšší procentuální zaplnění buněk polymerem P(3HB) a současně rostoucí trend exprese všech genů. Naopak na minerálním médiu transkripce jednotlivých genů po počáteční silné exprimaci pouze klesala a také zaplnění buněk bylo nižší. Získané poznatky přispívají k pochopení nejen exprese vybraných genů ale také celkové syntézy PHA. Současně otevírají cestu k optimalizaci produkce s cílem snížit výrobní cenu a rozšířit tak jejich uplatnění.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, genová exprese, extremofily, termofilní bakterie, *Aneurinibacillus*

Abstract

Polyhydroxyalkanoates are microbial storage polymers that represent a green alternative to petrochemical plastics. However, their high production cost limits wider industrial utilization. Use of waste materials as a substrate and/or utilization of extremophilic organisms is an option to reduce production costs. The strain of thermophilic bacteria *Aneurinibacillus* appears to be a promising producer because of its ability to synthesize wide range of non-traditional copolymers. In addition, PHA synthesis is independent of nutrient limitation, which was the subject of this study. Experiments were focused on the expression of genes involved in PHA synthesis in the bacterium *Aneurinibacillus sp.* AFn2 on different types of production media. The presence of selected genes was verified using classical PCR. After that the cultivation experiments were performed on mineral and complex media to simulate environments with different nutrient availability. Biomass concentration was determined gravimetrically from the samples collected in time during the growth curve measurement. PHA content was measured simultaneously using gas chromatography. Finally, the expression of the studied genes was analysed by RTqPCR. Significant differences were observed in the transcription of individual genes depending on the media type and time. The results confirmed the ability of *Aneurinibacillus sp.* AFn2 to produce PHA independently on nutrient limitation, however, the production rate and cell filling depended on the media type. This fact may be related to the different course of expressed genes involved in PHA synthesis. A higher percentual yield of P(3HB) in cells were observed in complex media along with an increasing trend in the overall gene expression. On the other hand, in mineral medium, the transcription of individual genes only decreased after initial strong expression, and the cell filling of P(3HB) was also lower. The findings lead to understanding not only the expression of selected genes but also the overall synthesis of PHA. At the same time, it offers the way to optimize production with the aim of reducing cost and expanding their market applications.

Keywords

Polyhydroxyalcanoates, gene expression, extremophiles, thermophilic bacteria, *Aneurinibacillus*

DVOŘÁKOVÁ, Dominika. Využití molekulárních technik při studiu termofilních mikroorganismů. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156619>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Iva Buchtíková.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že 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.

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ivě Buchtíkové, Ph.D. za její optimistický přístup k celé práci a ochotu zodpovědět všechny mé dotazy. Velké poděkování patří i mé konzultantce Ing. Kataríně Šlosárové, která mě s trpělivostí a pochopením provázela celou prací. Jsem velmi vděčná za to, že jsem s oběma mohla pracovat a mnoho se od nich naučit. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům, jenž mě i v nelehkých chvílích studia podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1 Chemická struktura	10
2.1.2 Fyzikální vlastnosti	10
2.1.3 Biosyntéza PHA	11
2.1.4 Biodegradace PHA	14
2.2 Extremofilní mikroorganismy	15
2.2.1 Termofilní mikroorganismy	16
2.2.2 Využití extremofilů	17
2.2.3 Termofilní producenti PHA	18
2.3 Genová exprese	20
2.3.1 Housekeeping geny	20
2.3.2 Metody měření genové exprese	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Použité přístroje	22
3.2 Použité chemikálie	22
3.2.1 Chemikálie použité pro kultivaci	22
3.2.2 Chemikálie pro molekulární techniky	23
3.2.3 Ostatní chemikálie	24
3.3 Použité mikroorganismy	25
3.4 Příprava inokula a uchovávání kultury	25
3.5 Izolace DNA	25
3.6 Polymerázová řetězová reakce	26
3.7 Elektroforéza na agarosovém gelu	27
3.8 Optimalizace kvantitativní polymerázové řetězové reakce	27
3.9 Izolace RNA	29
3.9.1 Kit Geneproof	30
3.9.2 Kit Geneproof s TRIzolem	30
3.9.3 Kit Macherey	31
3.9.4 Kit Macherey v různých kombinacích s TRIzolem	31
3.10 Reverzní transkripce mRNA na cDNA	32
3.11 Růstová křivka	32
3.11.1 Gravimetrické stanovení množství biomasy	32
3.11.2 Odběry vzorků pro izolaci RNA	33
3.11.3 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty	33
3.11.4 Stanovení množství PHA pomocí plynové chromatografie	33
3.11.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	33

3.11.6	Porovnání koncentrace cDNA pro měření genové exprese	33
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	35
4.1	Optimalizace.....	35
4.1.1	Testování primerů pro PCR	35
4.1.2	Teplotní nastavení annealingu	36
4.1.3	Složení směsi pro qPCR.....	38
4.2	Porovnání metod izolace RNA pomocí komerčních kitů.....	41
4.3	Růstová křivka.....	43
4.3.1	Stanovování optické hustoty	43
4.3.2	Stanovení biomasy a PHA	44
4.3.3	Izolace RNA a její přepis do cDNA.....	45
4.3.4	Porovnání vhodné koncentrace cDNA pro qPCR.....	48
4.3.5	Měření genové exprese	49
5	ZÁVĚR.....	52
6	REFERENCE	53
7	SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK	61
8	PŘÍLOHY	62

1 ÚVOD

Ekologie a dopad lidské činnosti na přírodu se v posledních letech stává čím dál častějším tématem. Jednou z mnoha řešených otázek je také problematika související se syntetickými plasty a jimi způsobené znečištění. Tyto materiály se staly již běžnou součástí všech lidských životů zejména díky jejich všestrannému použití a nízkým výrobním nákladům. Vysoké poptávce odpovídá i množství plastů, které je ročně vyprodukováno. Většina plastových výrobků bohužel neslouží k opakovanému použití. I přes to, že je určitá část vyhozených plastů recyklována nebo spálena, končí většina ve volné přírodě, kde se jen stěží rozkládá. Hromadící se plasty mají dopad na celý ekosystém, což vyvolává znepokojení a snahu tento problém řešit.

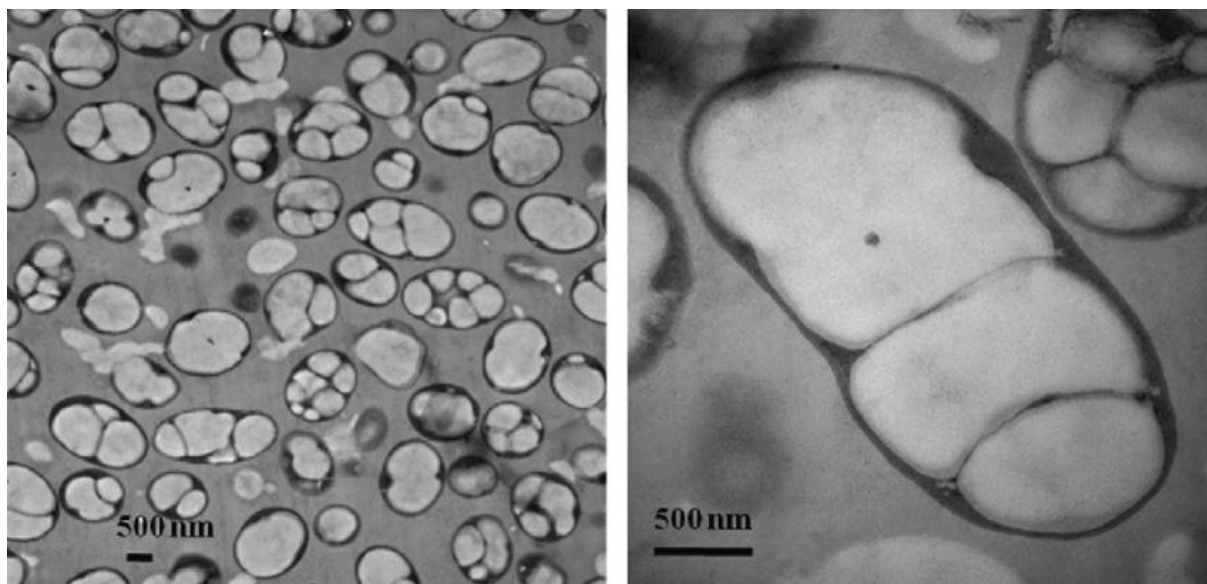
Zvýšení podílu recyklovaných plastů vede pouze k dočasnému, nikoli dlouhodobě udržitelnému zlepšení. Jednou z možných variant řešení, zejména v případě jednorázových plastů, je nahrazení jejich syntetických podob jinou alternativou. V úvahu připadají různé druhy přírodních materiálů, mezi něž patří i polyhydroxyalkanoáty (PHA). Ty jsou svými vlastnostmi plastům velice podobné, avšak v přírodě poměrně snadno rozložitelné. PHA jsou produkovány i rozkládány mikroorganismy, a tak tvoří přirozenou součást ekosystému. Značnou nevýhodou PHA je jejich vysoká cena způsobená především drahým uhlíkatým substrátem pro růst mikroorganismů, udržováním sterilního procesu a purifikace výsledného produktu. Tyto faktory brání jejich širší expanzi na trh. Za účelem snižování výrobních nákladů jsou zkoumány například varianty využívání odpadních substrátů jako zdroje živin, nebo produkce pomocí extremofilních organismů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou organické sloučeniny, které řadíme do skupiny polyesterů hydroxyalkanových kyselin [1]. Poprvé byly pozorovány v roce 1926 francouzským vědcem Lemoignem, který u bakterie *Bacillus megaterium* zkoumal produkci homopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu), P(3HB) [2]. Od té doby bylo objeveno mnoho dalších prokaryotických organismů produkujících rozmanité typy PHA. Vesměs se jedná o grampozitivní nebo gramnegativní bakterie a také různé druhy archeí [3]. Obecně vykazují izolované PHA podobné vlastnosti jako petrochemické plasty. Významným rozdílem je ovšem jejich biodegradabilita a biokompatibilita v přírodě. Především díky těmto znakům poutají pozornost v oblasti udržitelného rozvoje [4].

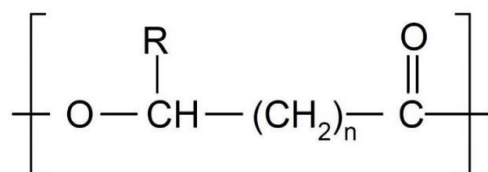
Degradabilita PHA polymerů je podmíněna jejich biologickým významem. Jak znázorňuje obrázek 1, mikroorganismy tvoří intracelulárně nerozpustné PHA granule o velikosti 200 až 500 nm v průměru, které jsou za nepříznivých podmínek využívány jako zdroj energie a uhlíku [5]. Karbonosomy, což je také jiné označení pro tyto granule, mají hydrofobní jádro tvořené amorfními molekulami PHA. Naopak na povrchu se vyskytují různé asociované proteiny například phasiny. Jedná se o amfipatické proteiny, které zabezpečují existenci granulí ve vodném prostředí cytoplazmy [6]. Vedle phasinů dále na povrchu inkluzí nalezneme enzymy spojené s jejich anabolismem, katabolismem a regulační proteiny těchto drah. Kromě primární zásobní funkce vystupují karbonosomy i v dalších biologických pochodech. Jedním z nich je například zvyšování odolnosti vůči stresovým podmínkám (extrémní teplota, osmotický tlak, UV záření nebo oxidativní stres). Za těchto okolností funguje 3-hydroxybutyrát (3HB) jako ochranný chaperon čili látka, která brání denaturaci buněčných proteinů [2].



Obrázek 1: *Halomonas* TD08 obsahující PHA granule; snímek z transmisního elektronového mikroskopu [7]

2.1.1 Chemická struktura

Obecnou chemickou strukturu polyhydroxyalkanoátů popisuje obrázek 2. Typicky se jedná o 3-hydroxyalkanové kyseliny, které tvoří monomerní jednotku. Při formování polymeru vzniká esterová vazba mezi hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku jednoho řetězce a karboxylovou skupinou druhého [4]. Dodnes je známo přes 150 různých druhů monomerů. Nejčastěji s lineárním řetězcem, což ovšem není podmínkou. Mohou se vyskytovat i rozvětvené, aromatické, či libovolně substituované postranní řetězce [8]. V závislosti na struktuře molekuly se mění její mechanické a technologické vlastnosti. I přes velkou rozmanitost monomerů je vždy hydroxylová skupina v konfiguraci R, což je dáno substrátovou specifitou enzymu katalyzujícího následnou syntézu polymerů [9].



Obrázek 2: Obecná chemická struktura polyhydroxyalkanoátů (PHA), upraveno z [10]

Podle typu monomerů lze rozdělit PHA na homopolymery a heteropolymery. Homopolymery obsahují pouze jeden druh monomerů na rozdíl od heteropolymerů, v nichž se vyskytují alespoň dvě odlišné náhodně poskládané jednotky. Speciální podskupinu heteropolymerů tvoří blokové kopolymery, ve kterých se pravidelně opakuje více monomerních jednotek [11].

Podle počtu uhlíků v řetězci rozlišujeme tři základní skupiny polyhydroxyalkanoátů. PHA s krátkým řetězcem (short chain length PHA, scl-PHA) tvořené 3–5 uhlíky, PHA se středně dlouhým řetězcem (medium chain length PHA, mcl-PHA) obsahující 6–14 uhlíků, a ne příliš obvyklé PHA s dlouhým řetězcem (long chain length PHA, lcl-PHA) sestávající z více než 14 uhlíků v řetězci. Do první skupiny scl-PHA řadíme 3-hydroxybutyrát (3HB) nebo 3-hydroxyvalerát (3HV), zatímco zástupcem mcl-PHA je například 3-hydroxyhexanoát (3HHx) [12].

2.1.2 Fyzikální vlastnosti

Fyzikální vlastnosti jsou výrazně závislé na délce postranního řetězce a chemické struktuře polymeru. Obecně jsou scl-PHA spíše pevné a křehké. Je pro ně charakteristický vyšší stupeň krystalinity (60–80 %). Teplota tání úměrně stoupá s počtem uhlíků v postranním řetězci [13], se kterým se zvyšuje i elasticita polymeru [14]. Naopak PHA se středně dlouhým řetězcem jsou spíše amorfní, mají nižší stupeň krystalinity (24 %) i nižší bod tání [15]. Výraznou změnu vlastností pozorujeme při tvorbě kopolymerů. Příkladem spojení dvou různých monomerních jednotek s krátkým řetězcem je poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxyvalerát), který má oproti P(3HB) značně nižší teplotu tání a vyšší elasticitu, zejména při větším zastoupení 4HV [16]. Kombinací scl-PHA a mcl-PHA je například poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát), P(3HB-co-3HHx), který se se zvyšujícím počtem 3HHx také stává elastičtější [12]. Porovnání fyzikálních vlastností vybraných polymerů PHA s petrochemickými plasty udává tabulka 1.

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti vybraných polymerů, upraveno z [17]

Název polymeru	Bod tání [°C]	Pevnost v tahu [Pa]	Délkové prodloužení při přetržení [%]
P(3HB)	177	43	5
P(3HB-co-10mol% 3HV)	152	21	400
P(3HB-co-64mol% 4HV)	50	17	591
P(3HB-co-10mol% HHx)	151	21	400
P(3HB-co-17mol% HHx)	120	20	850
Polypropylen	186	38	400
Polyetylen	262	36	8300

2.1.3 Biosyntéza PHA

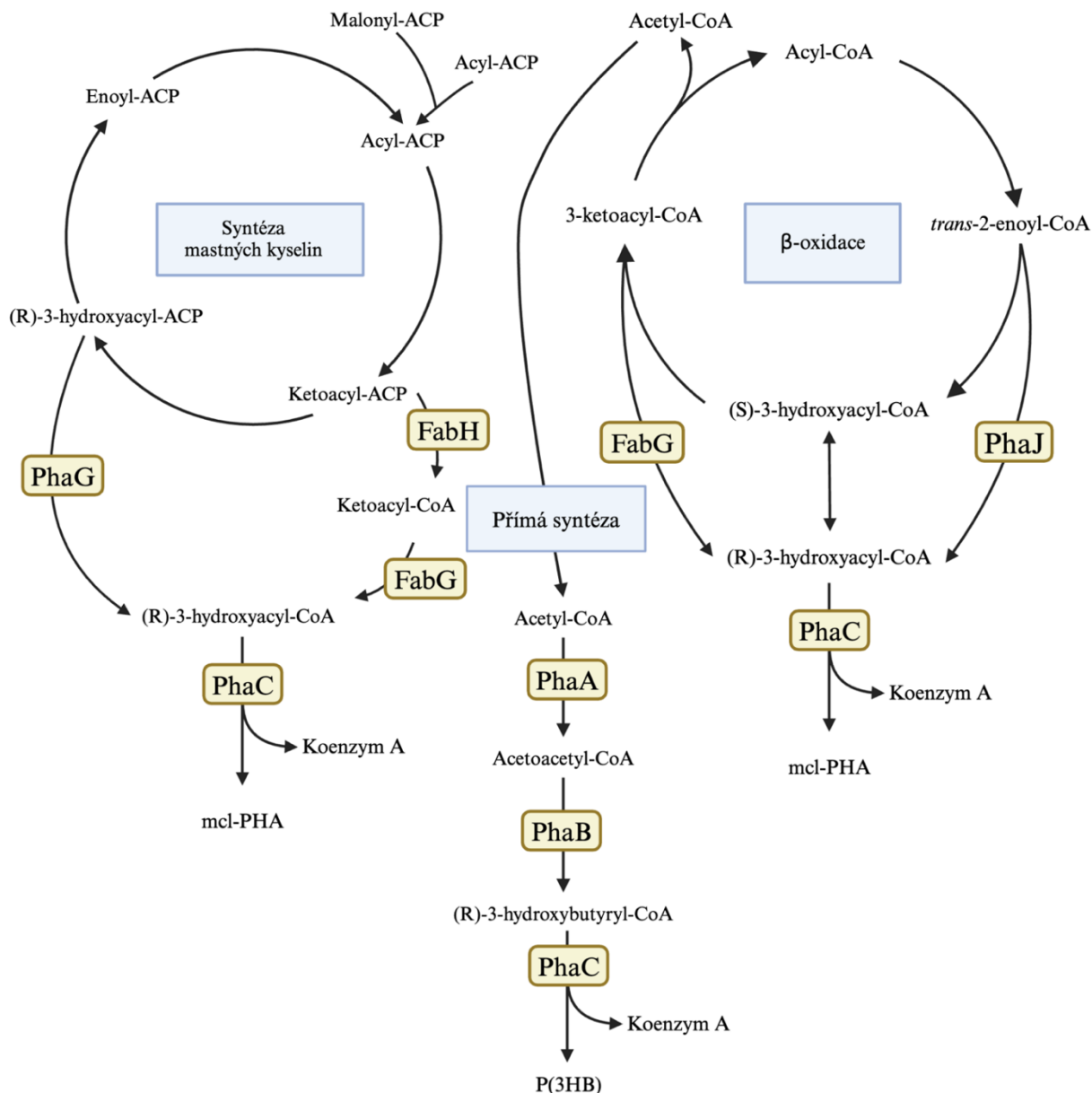
Dodnes je známo přes 500 druhů mikroorganismů se schopností produkce PHA [17]. Rozlišujeme dvě skupiny producentů v závislosti na vnějších podmínkách, při kterých syntéza nastává. První skupina vyžaduje nadbytek uhlíkatého substrátu a limitaci některé z živin, jako je například dusík, fosfor, síra nebo kyslík. PHA se pak tvoří jako sekundární metabolit ve stacionární fázi růstu. Naproti tomu druhá skupina dokáže produkovat PHA již během růstové fáze bez jakékoli limitace [9, 13].

Biosyntéza PHA je sled několika enzymaticky katalyzovaných reakcí probíhajících v cytosolu. Významnou roli při ní hraje druh využívaného uhlíkatého substrátu, který podmiňuje charakter výsledného polymeru [18]. I přes to, že bylo u prokaryot pozorováno více různých způsobů biosyntézy PHA [13], lze definovat tři hlavní metabolické dráhy spojené s tvorbou polyhydroxyalkanoátů, které znázorňuje obrázek 3.

Nejčastější a nejlépe prostudovaná je přímá syntéza scl-PHA, konkrétně P(3HB). Výchozím substrátem je acetyl-CoA, který se v buňce vyskytuje jako produkt glykolýzy, zpracování mastných kyselin nebo uhlíkatých zbytků aminokyselin [19]. V prvním kroku nastává kondenzace dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Tato reakce je katalyzována 3-ketothiolázou (PhaA). V následujícím kroku je acetoacetyl-CoA redukován NADPH dependentní acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) a tvoří se 3-hydroxybutyryl-CoA. V posledním kroku podléhá 3-hydroxybutyryl-CoA polymerizační reakci katalyzované PHA syntázou (PhaC) za současného uvolnění koenzymu A [17, 20].

Další možnosti biosyntézy jsou propojené s katabolismem a anabolismem mastných kyselin. Prvním z nich je syntéza vycházející z β -oxidace čili katabolismu mastných kyselin. Výchozím substrátem pro PHA syntázu (PhaC) je (R)-3-hydroxyacyl-CoA, který lze získat ze tří meziproduktů β -oxidace. Konkrétně je to *trans*-2-enoyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA a 3-ketoacyl-CoA. V případě přeměny *trans*-2-enoyl-CoA dochází ke katalytické hydrataci za pomoci (R)-specifické enoyl-CoA hydratázy (PhaJ). Pomocí izomerace lze přeměnit také konfiguraci (S)-3-hydroxyacyl-CoA. Na konverzi 3-ketoacyl-CoA se podílí 3-ketoacyl-CoA reduktáza (FabG). Výslednými produkty polymerace jsou mcl-PHA [9, 13].

Poslední biosyntetická dráha souvisí se syntézou mastných kyselin. Několikanásobnou kondenzací acetyl-ACP a malonyl-ACP dochází k elongaci řetězce a vzniku (R)-3-hydroxyacyl-ACP o různé délce. V této reakci se nejvýznamněji uplatňuje enzym malonyl-CoA-ACP transacyláza (FabD). V následujícím kroku je (R)-3-hydroxyacyl-ACP přeměněn na (R)-3-hydroxyacyl-CoA za účasti 3-hydroxyacyl-CoA-ACP transferázy (PhaG). Nakonec je pomocí PHA syntázy syntetizován mcl-PHA [13, 18].



Obrázek 3: Schéma základních metabolických drah biosyntézy PHA, upraveno z [13]

Kromě již zmíněných enzymů se při syntéze uplatňuje také velká řada dalších proteinů. Významné jsou například PhaI nebo PhaF, které ovlivňují rychlost produkce a morfologii karbonosomů v buňce [21]. Neméně podstatnou roli mají regulační proteiny PhaQ fungující jako represory. Naopak PhaM účinkují jako aktivátory a urychlovače syntézy. Přehled enzymů a proteinů spojených s biosyntézou PHA představuje tabulka 2 [22].

Tabulka 2: Přehled enzymů a jiných proteinů souvisejících se syntézou PHA společně s jejich geny a funkcí [18, 19]

Gen	Protein	Funkce
<i>phaA</i>	3-ketothioláza	Kondenzace acetyl-CoA
<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reduktáza	Redukce acetoacetyl-CoA
<i>phaC</i>	PHA syntáza	Polymerizace monomerních jednotek
<i>phaF</i>	PhaF	Povrchově asociovaný regulační protein
<i>phaG</i>	3-hydroxyacyl-CoA-ACP transferáza	Transfer koenzymu A na místo ACP
<i>phaI</i>	PhaI	Povrchově asociovaný regulační protein
<i>phaJ</i>	enoyl-CoA hydratáza	Hydratace enoly-CoA
<i>phaP</i>	phasiny	Strukturní protein stabilizující granule PHA
<i>phaM</i>	urychlovače syntézy	Urychlení katalytické aktivity PHA syntázy
<i>fabG</i>	FabG protein	Redukce 3-ketoacyl-CoA na 3-hydroxyacyl-CoA
<i>fabD</i>	malonyl-ACP transacyláza	Přenos acylového zbytku z koenzymu A na ACP

Geny pro metabolismus PHA se v bakteriálním chromozomu vyskytují obvykle v operonech. Nejprostudovanější je *phaCAB* operon nalezený například u druhu *Cupriavidus necator* H16. Tento klastr kóduje tři hlavní geny přímé syntézy scl-PHA (*phaA*, *phaB* a *phaC*) a gen pro strukturní proteiny phasiny (*phaP*). V závislosti na bakteriálním druhu se geny v operonech mohou lišit [23].

2.1.3.1 PHA syntáza

Klíčovým enzymem pro biosyntézu PHA je již dříve zmiňovaná PHA syntáza. Jedná se o přísně stereospecifický enzym, který dokáže polymerizovat pouze monomery v konfiguraci R. Podle substrátové specifity a podjednotkového složení rozlišujeme čtyři základní třídy PHA syntáz.

Třída I je tvořena pouze jednou jednotkou PhaC o molekulové hmotnosti 60–70 kDa. Substrátem pro tuto syntázu jsou thioestery s délkou řetězce 3–5 uhlíků. Katalyzuje tedy vznik scl-PHA. Typickým zástupcem je druh *Cupriavidus necator* H16 [20].

Pouze jednou podjednotkou je tvořena také PHA syntáza třídy II. Jedná se o PhaC1 nebo PhaC2 jednotky o molekulové hmotnosti přibližně 60 kDa. Substrátem jsou meziproducty β -oxidace nebo syntézy mastných kyselin, proto vznikají polymery se středně dlouhým řetězcem. Typickými představiteli této třídy jsou zástupci rodu *Pseudomonas* [21].

Na rozdíl od předchozích dvou tříd je třída III a třída IV heterogenní. V obou případech nese katalyticky aktivní místo PhaC jednotka, které pro plnou funkčnost ovšem vyžaduje přítomnost další podjednotky. V případě třídy III se jedná o PhaE s molekulovou hmotností 20–40 kDa. Charakteristickými kmeny jsou *Allochromatium* nebo *Haloarchaea*, které zpracovávají monomery s délkou řetězce 3–5 uhlíků za vzniku scl-PHA [1].

V poslední třídě IV je PhaC doplněna PhaR jednotkou, jejíž molekulová hmotnost je přibližně o polovinu menší než PhaC. Podle substrátové specifity rozlišujeme dvě podskupiny. První objev třídy IV byl učiněn u druhu *Bacillus megaterium*, proto první podskupinu označujeme jako třídu IVm. Druhá podskupina byla pozorována u druhu *Bacillus cereus* a nese tedy název třída IVc. Obě skupiny katalyzují primárně vznik scl-PHA z 3HB nebo 3HV. Minoritně mohou být substrátem i jiné monomery jako 3HHx nebo 4HB, které vedou k tvorbě kopolymerů. Oproti ostatním třídám PHA syntáz vykazuje třída IV zvláštní schopnost využívat alkoholy jako substrát pro polymerizační reakci [22].

Kromě výše zmíněných tříd existují PHA syntázy, které vykazují pouze podobnost s některou ze skupin, ale nelze je jednoznačně zařadit. Navzdory rozmanitým strukturám a podjednotkovému složení syntáz zůstává napříč všemi třídami zachované aktivní centrum tvořené cysteinem, kyselinou asparagovou a histidinem. Pořadí těchto aminokyselin v řetězci se může lišit, ale výsledný mechanismus katalýzy zůstává zachován [20].

PHA syntázy se v katalyticky funkční podobě vyskytují jako dimery a nesou tedy dvě aktivní místa. V závislosti na mechanismu katalýzy mohou mezi sebou tyto centra spolupracovat, jako je tomu v případě ping-pingového modelu, nebo dochází k elongaci pouze v jednom aktivním centru v případě modelu sekvenčního [20, 23].

2.1.4 Biodegradace PHA

Biodegradace je způsob rozkladu materiálu za pomoci mikroorganismů, především bakterií a hub. Na katabolismus PHA je vázána celá řada organismů, například rody *Actinomyces*, *Aspergillus*, *Bacillus* nebo *Clostridium*. Způsob degradace a využívání jejích produktů se u jednotlivých druhů liší [24].

Mikroorganismy, které mají schopnost syntetizovat PHA, disponují současně i enzymy pro jejich intracelulární rozklad. Tato metabolická dráha je využívána v případě nedostatku uhlíku v buňce a nejdůležitější roli v ní hrají hydrolytické PHA depolymerázy (PhaZ). Tyto enzymy s úzkou substrátovou specifikou zabezpečují uvolňování monomerních jednotek z polymeru. Využívají tedy pouze typ PHA, který buňka umí syntetizovat. Produkty degradace mohou být zpracovány v β -oxidaci, pokud se jednalo o mcl-PHA, nebo přeměněny zpět na acetyl-CoA v případě P(3HB) [25].

Vedle vnitrobuněčného zpracování PHA mohou mikroorganismy tvořit PHA depolymerázy i extracelulárně. Tato schopnost je významná pro biodegradaci produktů z polyhydroxyalkanoátů v přírodě. Substrátová specifita extracelulárních PHA depolymeráz není tak úzká jako intracelulárních, proto využívají širokou základnu PHA polymerů [25]. Navíc produkce extracelulárních PHA depolymeráz není podmíněna schopností biosyntézy samotných polyhydroxyalkanoátů. Mimobuněčné PHA tvoří v mnoha případech pro mikroorganismy potenciální zdroj živin. Aby mohli být využity, je nutné rozložit polymer na monomery rozpustné ve vodě, které procházejí přes membránu do buňky. Při hydrolyze polymerů se nejprve PHA depolymerázy adsorbují na povrch krystalu a následně nespecificky štěpí kovalentní vazby za vzniku různě dlouhých oligomerů. Lipázy v dalším kroku hydrolyzují oligomery až na monomery, které je buňka schopna využívat [24].

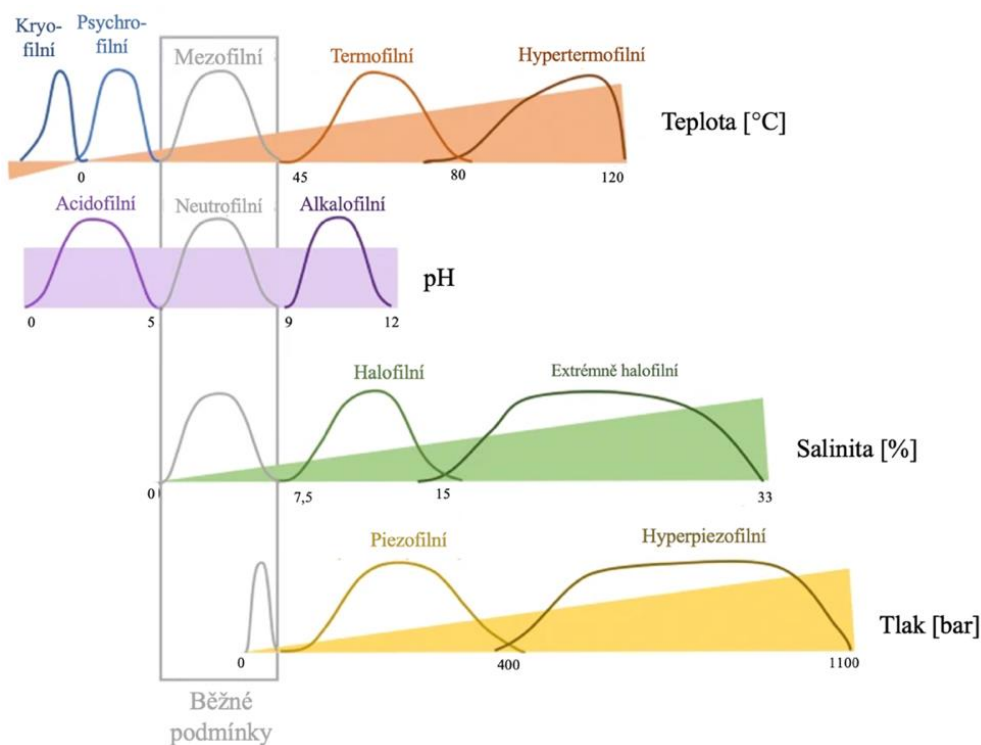
K degradaci PHA dochází ve všech typech prostředí, například půda, mořská voda, aktivovaný kal nebo kompost, a to za aerobních i anaerobních podmínek [26] V případě

aerobního zpracování se uvolňuje oxid uhličitý a voda, naopak v anaerobních podmínkách je hlavním produktem methan, popřípadě oxid uhličitý a voda [24].

Na rychlost degradace má velký vliv charakteristika okolního prostředí jako je teplota, vlhkost, salinita, pH, množství kyslíku a mikrobiální populace. Neméně podstatnou roli hraje samotná struktura PHA, její molekulová hmotnost, délka postranního řetězce, krystalinita a charakter povrchu. Obecně se homopolymery rozkládají hůře z důvodu vysoké krystalinity. Platí však, že rychlost jejich degradace roste s prodlužujícím se postranním řetězcem. Naopak kopolymery nemají tak vysokou krystalinitu a jejich povrch je poréznější, což vede k rychlejší degradaci [26, 27].

2.2 Extremofilní mikroorganismy

Mikroorganismy mají vysokou schopnost adaptace na fyzikální, chemické a biologické faktory. Vyskytují se tedy přirozeně na různých místech Země. Řada organismů žije v běžných podmínkách (podmínky optimální pro růst většiny organismů). Nalézáme ovšem i druhy schopné přežít v nestandardních prostředích. Takové mikroorganismy nazývané extremofilní. Osidlují například sopečné oblasti, hydrotermální průduchy, solná jezera, ledové oceány mořské hlubiny a další [28]. Nejen že jsou extremofily schopni tyto podmínky přežít, dokonce je pro svůj optimální růst vyžadují. Zástupce těchto mikroorganismů nalézáme ve všech doménách. Především se však jedná o archea a bakterie, což je dáno plasticitou jejich genomu. Vysoká flexibilita při práci s jednotlivými geny vede k lepší schopnosti přijímat mutace [29].



Obrázek 4: Základní rozdělení extremofilních organismů s jejich optimálními podmínkami růstu, upraveno z [28]

Rozdělení extremofilů podle optimálních podmínek růstu popisuje obrázek 4. Kromě těchto základních kategorií známe mnoho dalších menších skupin, jako jsou xerofilní organismy vyžadující pouze nízké procento vody v prostředí. Oligotrofní druhy rostoucí při limitaci některé ze základních živin. Metalofilní mikroorganismy prosperující v přítomnosti těžkých kovů (Cd, Zn, Cu, Co, Pb) nebo radiorezistentní druhy vyskytující se v prostředí s radiací. Některé mikroorganismy jsou adaptovány na více faktorů současně, poté je označujeme jako polyextremofilní. Nejčastěji se jedná o acidotermofilní nebo alkalohalofilní [30].

2.2.1 Termofilní mikroorganismy

Teplota je jedním ze základních fyziologických faktorů růstu. Obecně jsou mikroorganismy schopné lépe snášet nízké teploty, při kterých nastává nejprve zpomalení reprodukce a následně i růstu. Postupným snižováním teploty je možné dosáhnout letálních účinků. Oproti tomu vysoké teploty působí destruktivně podstatně dříve, jelikož dochází k denaturaci proteinů a tím i k zastavení metabolismu [31]. Termofilní organismy si však vyvinuli mechanismy, jak se na vysoké teploty adaptovat. Osidlují tak například sopečné oblasti, geotermální jezera, hlubokomořské hydrotermální průduchy, komposty nebo gejzíry, což představuje široké teplotní spektrum od 45 °C do 120 °C [32].

Druhy, které jsou schopné prosperovat jak při běžných podmínkách, tak při vyšších teplotách (do 50 °C) označujeme jako termotolerantní. Oproti tomu termofilní organismy nejen snášejí, ale dokonce vyžadují vyšší teplotní optimum pro své přežití [33]. Běžně dělíme termofilní organismy do tří základních skupin podle teplotního optima růstu: mírně termofilní organismy žijící při teplotách v rozmezí 45-65 °C, extrémní termofily prosperující v teplotách až 80 °C a hypertermofily, jejichž optima přesahují 80 °C [34].

Mezi termofilními organismy se vyskytují zástupci ze všech domén. Nejméně typické jsou vysoké optimální teploty růstu pro eukaryota. Jedná se především o vybrané druhy hub, které spadají do kategorie mírných termofilů a nejsou schopny snášet teploty vyšší než 60 °C. Běžně se nacházejí v kompostu, kde napomáhají mineralizaci organického uhlíku. Mnohem početnější skupinu termofilních organismů tvoří bakterie. Jejich zástupce nalézáme napříč všemi teplotními optimy. Dva bakteriální druhy (*Aquifex aeolicus* a *Thermotoga maritima*) se řadí dokonce mezi hypertermofily. Nejtypičtějšími zástupci hypertermofilů jsou však jednoznačně archea [30, 35, 36].

Pro přežití těchto extrémních podmínek využívají všechny termofilní mikroorganismy podobné mechanismy. Jednou z možností je produkce specifických látek, které slouží jako ochrana biomolekul před agregací a denaturací. Obecným příkladem mohou být proteiny teplotního šoku (HSP z anglického heat shock proteins). Tyto látky pomáhají nejen termofilním, ale také mezofilním organismům vyrovnávat se s vyšší teplotou tím, že opravují denaturované části proteinů [32].

Další nutností je změna ve struktuře fosfolipidové membrány, která odděluje vnitřní prostředí buňky od okolí. Se vzrůstající teplotou se membrána stává fluidnější a propustnější. Aby byla zachována homeostáza je nutné strukturu membrány změnit. Strategií termofilních bakterií je využívání většího podílu nasycených, dlouhých a rozvětvených mastných kyselin pro tvorbu fosfolipidů. Oproti tomu u hypertermofilních archeí se ve fosfolipidech vyskytují navíc etherové vazby [36].

Také muselo dojít k adaptaci samotné molekuly DNA. Obecně lze říci, že prokaryotní genom je kompaktnější než eukaryotní, který obsahuje větší množství intergenové DNA. Tato skutečnost přináší výhodu v podobě kratší doby dělení. Termofilní organismy mají navíc ještě menší velikost genomu než psychrofilní nebo mezofilní organismy. Ke stabilitě nukleové kyseliny přispívá i její nadmolekulární struktura. Toto nadšroubovicové vinutí značně zvyšuje počet vazeb, čímž zvyšuje odolnost vůči teplotní denaturaci [37]. Změna genetické informace s sebou nese i změnu ve struktuře proteinů. Termostabilní proteiny jsou menší a jednodušší, což vychází z celkového zmenšení genetické informace. Na jejich teplotní stabilizaci se z velké části podílí vznik disulfidických můstků a jiných nekovalentních interakcí [36].

2.2.2 Využití extremofilů

Unikátní vlastnosti extremofilů z nich činí oblast zájmu v mnoha vědeckých odvětvích. Jedním z příkladů je astrobiologie, kde jsou zejména polyextremofilní zástupci využíváni jako modelové organismy. Zkoumáním schopnosti přežití v simulovaných podmínkách různých vesmírných atmosfér jsme schopni studovat potenciál života mimo Zemi [38].

Další využití nalézají extremofilní organismy například v oblasti medicíny. Produkcí širokého spektra netypických látek by mohli pomoci například s řešením problému rezistence bakterií na aktuálně používaná antibiotika [39]. Kromě antibiotických látek lze aplikovat i extremofilní enzymy, tzv. extremoenzymy pro diagnostické účely (zejména PCR metody).

V neposlední řadě se extremofilní organismy stávají součástí řady biotechnologických procesů. Klasické chemické výroby s sebou nesou mnoho nevýhod jako jsou vysoké emise CO₂ a jiných polutantů, produkce z neobnovitelných zdrojů a další. Tyto stěžejní problémy lze do jisté míry vyřešit nahrazením chemických procesů biotechnologiemi, při kterých jsou využívány pro produkci živé organismy [40]. I přes to, že jsou biotechnologie ekologičtější, se stále potýkají s řadou nedostatků. Jedním z hlavních problémů je náchylnost procesů ke kontaminaci. S nutností udržování sterilního procesu se pojí vysoké náklady na energie a spotřeba vody. Výrobní náklady také rostou vlivem nutnosti chlazení fermentačního procesu (při fermentaci se uvolňuje metabolické teplo). Do ceny se rovněž propisuje druh zvoleného uhlíkatého substrátu. Proto je v dnešní době kladen důraz na tzv. biotechnologie příští generace (NGIB z anglického Next Generation Industrial Biotechnology), které se snaží eliminovat problémy klasických biotechnologií a tím plně konkurovat chemickému průmyslu. Použitím extremofilů lze vyřešit otázku sterilace, jelikož nestandardní podmínky růstu eliminují nárůst mezofilní mikroflóry. Pomocí termofilních producentů lze vyřešit i problém s chlazením reakce. Uvolňované metabolické teplo lze naopak využívat pro udržování potřebné optimální teploty, čímž se snižují náklady na chlazení reaktoru. Nejen z ekonomického, ale také z etického hlediska je vyvíjena snaha nahrazovat drahý substrát (glukóza, fruktóza) za jiné alternativy. Často využívané zdroje uhlíku do značné míry konkurují lidskému potravnímu řetězci, proto je usilováno o využívání jiných zdrojů, jimiž mohou být například odpadní produkty potravinářského průmyslu nebo zemědělství [41, 42].

Extremofily, respektive extremoenzymy jsou dnes již součástí mnoha běžně zavedených technologií. Jedním ze známých příkladů široce využívaného termostabilního enzymu je DNA polymeráza izolovaná z bakteriálního druhu *Thermus aquaticus*. Zisk tohoto enzymu způsobil rozvoj molekulární biologie, konkrétně dnes již běžně využívané polymerázové řetězové

reakce. Dalšími oblastmi aplikací extremofilů jsou potravinářský, textilní nebo papírenský průmysl [43]. Velmi aktuální je také téma biopaliv. Nejčastěji se jedná o butanol a biodiesel. Produkce těchto látek vyžaduje v určitých krocích poměrně drsné podmínky (teplota a pH). Vhodnými kandidáty jsou zde proto polyextremofily. Mimo jiné jsou extremofily častými producenty bioplastů. Některé další příklady využití extremofilů v uvádí tabulka 3 [30]

Tabulka 3: Příklady využití extremofilních organismů, upraveno z [30]

Organismus	Látka	Příklad aplikace
Halofilní	Betain	Stabilizační činidlo
	Bakteriorhodopsin	Organická elektronika
	Ektoin	Kosmetika
Termofilní	Proteázy	Potravinářství
	Amylázy	Hydrolýza škrobu
Psychofilní	Dehydrogenázy	Biosenzory
	Proteázy, lipázy	Detergenty
	β -laktosidáza	Potravinářství
Alkalofilní	Antibiotika	Medicína
	Pektinázy	Bělení buničiny

2.2.3 Termofilní producenti PHA

I při produkci polyhydroxyalkanoátů je snaha snižovat výrobní náklady a nahrazovat stávající mezofilní producenty extremofily. Důvodem jsou již výše zmiňované technologické výhody. Slibnou alternativou k mezofilním druhům při produkci PHA jsou termofilní organismy. Produkce probíhá většinou při teplotách v rozmezí 50–60 °C, což výrazně snižuje riziko vzniku kontaminace [1].

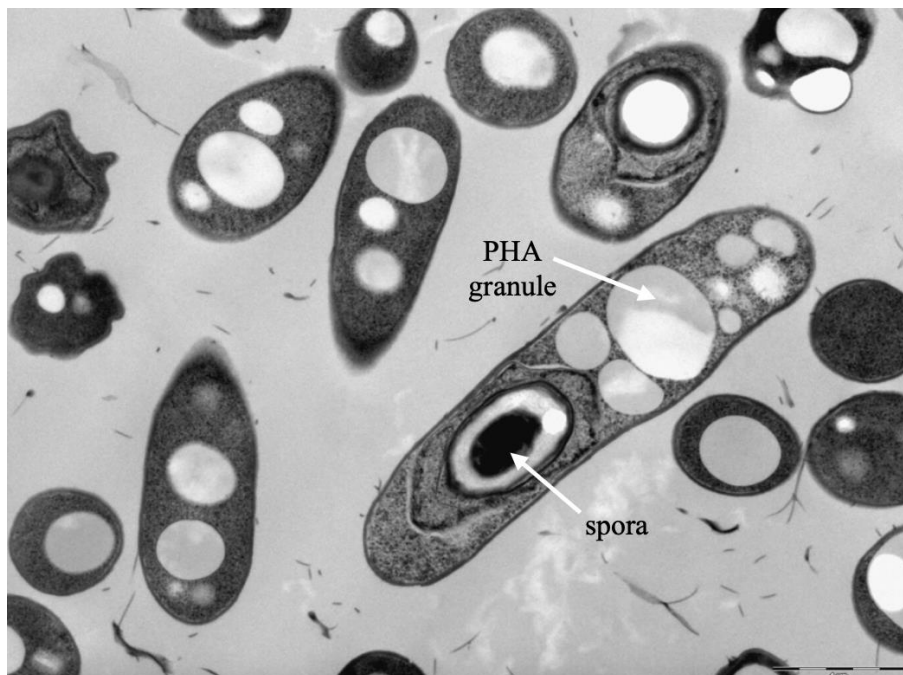
Příkladem termofilních gramnegativních bakterií je druh *Caldimonas thermodepolymerans*, který je schopen produkce P(3HB) a P(3HV), čili scl-PHA. Nejvyšší produkce polymerů byla pozorována při použití xylózy jako uhlíkatého substrátu. Preference xylózy před ostatními cukry je u PHA producentů netypická. Této vlastnosti by bylo možné biotechnologicky využívat při zpracování substrátů rostlinného původu. Vedle produkce PHA byla pozorována i exkrece extracelulárních PHA depolymeráz [44]. Dalším příkladem je kmen *Pseudomonas*, který je typickým producentem mcl-PHA. Navíc je často schopen využívat odpadní látky jako uhlíkatý substrát. U druhu *Pseudomonas citronellolis* byla pozorována produkce kopolymeru sestávajícího z 3-hydroxyhexanoátu a 3-hydroxyoktanoátu s využitím kyseliny octové jako substrátu. Kultivace byla prováděna v poloprovozním režimu (cca 600 l) [45]. Druh *Pseudomonas aeruginosa* MCC 5300 dosahuje vysokých výtěžků kopolymeru 3-hydroxydekanoátu a 3-hydroxydodekanoátu při růstu na olejové kyselině [46]. Dalším gramnegativním producentem PHA je rod *Chelatococcus* [1].

Jistou překážkou ve využívání PHA materiálů získaných z gramnegativních bakterií přináší přítomnost kontaminantů v polymerech. Přítomné lipopolysacharidy ve vnější membráně buněčné stěny přecházejí při izolaci do výtěžků PHA. Jelikož se jedná o endotoxiny, mohou způsobovat silnou imunologickou odezvu. Využití takto získaných polymerů je tedy

komplikované například v medicíně nebo potravinářství. Z tohoto důvodu je nutné hledat producenty PHA i mezi grampozitivními bakteriemi [47].

Stavba buněčné stěny grampozitivních bakterií je odlišná. A protože se v ní nevyskytují lipopolysacharidy, nepředstavuje kontaminace těmito látkami žádné riziko. Jedním z běžných grampozitivních producentů je rod *Bacillus*. U jeho termofilních zástupců byla pozorována produkce P(3HB-co-3HV) při 45 °C, ve výjimečných případech i mcl-PHA. Za poslední desetiletí se z tohoto rodu vyčlenilo několik dalších čistě termofilních kmenů například *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Aneurinibacillus* nebo *Thermobacillus* [1].

Potenciálně významným producentem PHA se jeví rod *Aneurinibacillus*. Jedná se o peritrichní bakterii tyčinkovitého tvaru s velikostí 0,7–1 μm × 3–6 μm. Charakteristickým znakem je tvorba elipsovitých endospor, které zobrazuje také obrázek 5. Vyskytuje se ve striktně aerobním prostředí (pouze jeden druh je mikroaerofilní), při optimální teplotě 20-60 °C a pH 5,5 – 9 [48]. Zástupci tohoto rodu vykazují vysokou flexibilitu při biosyntéze PHA. U druhu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* XH2 byla pozorována nejen tvorba P(3HB), ale také P(3HV) nebo 3-hydroxyoktanoát. Naopak syntéza netypických kopolymerů byla zjištěna u druhu označeného jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, který byl schopen z 1,4-butandiolu tvořit kopolymery s vysokým obsahem 4HB. Dalším rysem tohoto rodu je schopnost využívat laktony jako prekurzory pro tvorbu unikátních kopolymerů. Nevýhodou v biotechnologických aplikacích je tvorba spor v pokročilém stádiu kultivace. Vhodným řešením by mohl být zásah do genetické informace. První možností je vytvořit geneticky modifikovanou variantu bez schopnosti tvorby spor. Další způsob je využít jiné biotechnologicky vhodnější producenty modifikované o geny z rodu *Aneurinibacillus*. Zejména geny pro PHA syntázu představují možnost, jak rozšířit portfolio kopolymerů jinak vhodných kandidátů pro produkci PHA [49].



Obrázek 5: Snímek bakteriálního druhu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 z elektronového mikroskopu

2.3 Genová exprese

Veškeré informace potřebné pro vývoj, fungování a chování organismů jsou obsaženy v genetické informaci buněk. Nejčastěji se jedná o molekuly dvoušroubovice DNA, výjimku tvoří některé druhy virů. Informace jsou kódovány sekvencí nukleotidů v jednotlivých genech nacházejících se na chromozomech, jejichž struktura se liší v závislosti na doménách. Genová exprese je způsob vyjádření genetické informace do funkční podoby. Při jejím studiu se řídíme centrálním dogmatem molekulární biologie, který popisuje základní procesy při toku genetické informace, tedy replikaci, transkripci a translaci [50].

2.3.1 Housekeeping geny

Měření genové exprese je využíváno při kvantifikaci přepisu určitého genu v různých podmínkách. Stanovování lze provádět vůči interním standardům, kterými bývají takzvané housekeeping geny. Jejich exprese v buňce je stabilní nezávisle na okolí, jelikož kódují proteiny zabezpečující základní životní funkce. Jedním z těchto genů je například *gap*, gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu, klíčový enzym glykolýzy [51]. Vedle zisku energie je nezbytné udržovat nepoškozenou molekulu DNA. Na tomto procesu mají významný podíl proteiny RecA (*recA*). Jejich přítomnost v buňce zabezpečuje okamžitou odpověď na poškození DNA. V případě výskytu zlomu DNA se navazují na jednovláknovou část a spouští proces homologní rekombinace [52, 53].

Dalším příkladem jsou geny zabezpečující samotnou genovou expresi. Gen *16S rRNA* je přepisován do funkční molekuly rRNA, která tvoří jádro malé ribozomální podjednotky 30S. Společně s velkou ribozomální podjednotkou 50S vytvářejí kompletní ribozom 70S, kde následně dochází k proteosyntéze [54]. Jedná se o gen s délkou přibližně 1500 párů bází rozdělený do devíti hypervariabilních a devíti vysoce konzervovaných oblastí. Tento gen je typicky přítomný v genomu všech prokaryotních organismů. Konzervované části lze využít při potvrzení prokaryotního původu organismu. Naopak pro konkrétní fylogenetické a taxonomické zařazení lze studovat části hypervariabilní [55,56]. I geny s informacemi o ribozomálních proteinech podléhají v buňce stabilní expresi, což je opět dáno potřebou neustálé proteosyntézy pro přežití organismu. Jedním z příkladů je gen *L32* kódující stejnojmenný protein, který je součástí velké ribozomální podjednotky 50S [51, 54]. Vedle genů významných pro translaci lze využívat i sekvence nesoucí genetické informace o fungování transkripce. Příkladem může být *rpoD*, gen pro σ^{70} faktor. Tato sigma podjednotka je kofaktorem RNA polymerázy. Sigma faktor iniciuje transkripci tím, že se váže na promotor a po spojení s polymerázou vytváří holoenzym [57].

Při studování housekeeping genů u termofilních organismů (rod *Thermus*) byla pozorována také stabilní exprese DNA gyrázy (*gyrA*, *gyrB*), která katalyzuje tvorbu nadmolekulární struktury DNA při replikaci. Naopak jinak běžně používaný housekeeping gen *rpoC* (β podjednotka RNA polymerázy) podléhal při své expresi vlivu okolních podmínek [58]. U rodu *Bacillus* byl potvrzen stabilní přepis DNA gyrázy (*gyrA*, *gyrB*) [59], fosfofruktokinázy (*pfk*) nebo podjednotky DNA polymerázy (*polA*) [58].

2.3.2 Metody měření genové exprese

Pro potvrzení přítomnosti určitého genu v buňce je možné využít různé molekulární techniky. Jednou z nejstarších metod je Southern blot. Jeho princip spočívá ve štěpení molekul DNA pomocí restrikčních enzymů na menší fragmenty, které jsou následně separovány pomocí gelové elektroforézy a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Na membráně jsou hledané úseky DNA zvýrazněny pomocí radioaktivních vizualizačních sond [60]. Další dnes již dominantně používanou metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR). Cílové úseky DNA jsou označeny pomocí primerů (krátké specifické oligonukleotidy). Následně jsou v několika cyklech replikovány, až dojde k vytvoření milionů kopií. Po obarvení a separaci pomocí gelové elektroforézy je možné určit přítomnost určitého genu.

V případě měření koncentrace DNA lze využít metodu kvantitativní PCR (qPCR). Při této metodě lze sledovat aktuální množství kopií DNA po každém cyklu. Během amplifikace DNA je měřena intenzita fluorescence, které je přímo úměrná koncentraci produktů v reakční směsi. Vznik fluorescence je zprostředkovan přidávkem fluorescenčních činidel ke vzorku. Pomocí PCR technik lze analyzovat pouze molekuly DNA. Při studiu RNA molekul například v souvislosti s měřením genové exprese (nejčastěji mRNA nebo miRNA) je možné využít reverzní transkripci a získat tak jednovláknovou templátovou DNA (cDNA). Toto uspořádání je označováno jako reverzní transkripce s následným PCR (RT-qPCR) [61].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

Při experimentální části práce byly použity přístroje uvedené v následujícím seznamu a běžné laboratorní sklo.

- Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
- Centrifuga 5417R eppendorf
- Centrifuga EBA 200, Hettich
- Centrifuga SIGMA 1-14, Sartorius
- croBEE Real-time PCR systém, Geneproof
- Hlubokomrazicí box, Artico
- Laminární box, Euroclone BioAir Auro mini
- Magnetická míchačka, Biosan MMS-3000
- Nanofotometr, Implen P300
- Termocycler My CyclerTM, BIO-RAD
- pH metr pH 50+ DHS, XS Instruments
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300 (kolona Stabilwax (Restek) 30 m × 0,32 mm × 0,5 mikrometrů)
- Temperovaná třepačka, IKA KS4000i control
- Temperovaná třepačka, LABWIT ZWYR-D2401
- Termoblok Block heater SBH130D, Stuart
- Termostat, LTE IP100U
- Termostat, LTE IP60
- Termocycler My CyclerTM, BIO-RAD
- Spektrofotometr Nanodrop 2000, Thermo Scientific
- Visualization system c200, Azure Biosystem
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vodní lázeň, WLS
- Vortex BENCHMIXER, Benchmark Scientific Inc.
- Zdroj pro ELFO, PowerPac Basic BIO-RAD

3.2 Použité chemikálie

3.2.1 Chemikálie použité pro kultivaci

- CaCl₂ · 2H₂O (Lachema, CZE)
- CoCl₂ · 6H₂O (Lach-Ner, CZE)
- CuCl₂ · 2H₂O (Lach-Ner, CZE)
- D-glukosa (Lach-Ner, CZE)
- EDTA (Lach-Ner, CZE)
- FeCl₃ (Lach-Ner, CZE)
- Fe^{III} NH₄ citrát (Fluka, CZE)
- H₃BO₃ (Lachema, CZE)

- Kvasničný extrakt (Himedia, IND)
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Lach-ner, CZE)
- $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ (Lach-Ner, CZE)
- $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Lach-ner, CZE)
- NH_4Cl (Lach-Ner, CZE)
- Nutrient Broth (Himedia, IND)
- $ZnCl_2$ (Lach-Ner, CZE)

Tabulka 4: Složení používaných médií; NB – Nutrient broth; MM – minerální médium

Označení	Složka	Množství [g/l]			
NB	hovězí extrakt	10			
	NaCl	5			
	pepton	10	Stopové prvky	Složení [g/l]	
MM	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	9	TES II	EDTA	50
	KH_2PO_4	1,5		$FeCl_3$	8,3
	NH_4Cl	1		$ZnCl_2$	0,84
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2		$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,13
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1
	NH_4Fe^{III} citrát	0,0012		$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	0,016
	kvasničný extrakt	0,5		H_3BO_3	0,1
	po sterilaci				
	glukóza	10			
	TES II	1 ml/l			

3.2.2 Chemikálie pro molekulární techniky

- Brom-chlor-propan (Thermo Scientific, USA)
- DNA ladder 1 kb Plus (Nippon Genetics Europe, DEU)
- DNA ladder 100 bp (Nippon Genetics Europe, DEU)
- Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) (New England BioLabs, GBR)
- Master Mix SYTO-9 qPCR 2x (Top-Bio, CZE)
- Master Mix LightCycler 480 SYBR Green (Roche, DEU)
- $MgCl_2$ 25 mM (Thermo Scientific, USA)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, DEU)
- PCR agarosa (Top-Bio s.r.o., CZE)
- PCR H_2O (Braun, DEU)
- PCR nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, CZE)
- Proteináza K (New England BioLabs, GBR)
- RNase-free ethanol (Lach-Ner, CZE)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Lach-ner, CZE)
- TRIzol (Molecular research center, USA)

3.2.2.1 Použité kity

- Kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagal, DEU)
- Kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagal, DEU)
- PathogenFree RNA Isolation Kit (GeneProof, CZE)
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, DEU)

3.2.2.2 Primery

Použité primery a nejdůležitějšími informace o nich zobrazuje tabulka 5.

Tabulka 5: Seznam použitých primerů, jejich sekvence, velikost ampliconu a annealingová teplota

Gen	Primer	Sekvence (5' → 3')	Velikost ampliconu (bp)	Annealingová teplota (°C)
<i>phaJ</i>	PhaJ_F	GGAGTTGACCGGCGATGTAA	195	55
	PhaJ_R	TCACCAATTTTGACAGGCGC		
<i>phaP</i>	PhaP_F	TGTGGGATGGCTGGATGAAC	237	55
	PhaP_R	GCGCCATTCTTCAAACGTT		
<i>padR</i>	PadR_F	CCGATTAGTAGTGCGCCAA	144	55
	PadR_R	CGTCCGATACACGTTCCCT		
<i>phaR</i>	PhaR_F	CCCGTTCGATCTTTTTGCGA	202	55
	PhaR_R	TTCCCGGGAAGGCATGTTAG		
<i>fabG</i>	FabG_F	ATGACAACGGCTGCTCTCTC	208	55
	FabG_R	TGTCGATAAATCCGGGGCAG		
<i>phaC</i>	PhaC_F	ACACTGGGTATCATTCCACCGG	299	65/55*
	PhaC_R	GCGGCAATGTTTAGCACGTTTG		
<i>rpoD</i>	RpoD_F	CCGCAACCGTTAAGTGAAGA	180	55
	RpoD_R	GAGACCGATAGTGCCGATGG		
<i>recA</i>	RecA_F	CCCAACTTGCGCGCATATAC	180	65/55*
	RecA_R	TATTGCGCTCGGTATCGGTG-		
<i>16S rRNA</i>	16S_F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500	55
	16S_R	GGTACCTTGTTACGACT T		

*teplota používaná v hlavní části experimentu

3.2.3 Ostatní chemikálie

- Glycerol (Lachema, CZE)
- Hydroxid sodný (VWR, GBR)
- Chloroform (Lach-ner, CZE)
- Isopropyalkohol (Lach-Ner)
- Kyselina benzoová (Sigma-Aldrich, DEU)
- Kyselina sírová (VWR, GBR)
- Methanol (Supelco, DEU)

3.3 Použité mikroorganismy

V celé práci bylo pracováno s bakteriálním kmenem *Aneurinibacillus sp.* AFn2. Tento kmen byl izolován z aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod Bystřice pod Hostýnem v rámci disertační práce Ing. Ivy Buchtíkové, Ph.D [62]. Dále byla, jako pozitivní kontrola pro PCR používána DNA izolovaná z bakterie *Cupriavidus necator* H16 DSM 428.

3.4 Příprava inokula a uchovávání kultury

Potřebné množství NB média bylo rozpuštěno v destilované vodě. Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml bylo odměřeno 50 ml média, které bylo následně sterilováno. Sterilní médium bylo temperováno na 50 °C a zaočkováno 750 µl kultury z kryozkumavky (1 ml kultury v 10% glycerolu). Inokula byla vždy připravována v duplikátu. Následná kultivace probíhala v temperované třepačce (50 °C, 160 rpm) po dobu 24 hodin.

Pro dlouhodobé skladování kultury byly připraveny kryozkumavky smícháním 1 ml inokula po 24 h a 0,5 ml 30% glycerolu. Takto připravené vzorky byly uchovávány v hluboko mrazicím boxu při teplotě -80 °C až do dalšího použití.

3.5 Izolace DNA

Pro izolaci DNA bylo použito inokulum v NB médiu po 24 hodinách kultivace a izolační kit NukleoSpin Tissue. Bylo postupováno podle přiloženého návodu s úpravou některých kroků. Nejprve bylo odebráno 600 µl kultury do 1,5 ml mikrozukumavky. Po oddělení biomasy centrifugací (180 s, 4 000 rpm) byl odpipetován supernatant. Následně byla kultura homogenizována vortexováním se 100 µl BE pufru a přenesena do přiložené zkumavky NucleoSpin Bead Tube Type B (zkumavka se skleněnými kuličkami). Ke směsi bylo dále přidáno 40 µl roztoku MG a 10 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml. Za účelem uvolnění buněčného obsahu bylo provedeno mechanické narušení buněk pomocí střídavého třepání směsi v horizontální poloze a vortexování po dobu 10 minut. Pro oddělení pevných zbytků bylo k lyzátu přidáno 600 µl MG roztoku a celá směs byla centrifugována 30 s při 11 000 × g. V následujícím kroku bylo odebráno 600 µl supernatantu, ze kterého byla centrifugací (30 s při 11 000 × g) vázána DNA na kolonku NucleoSpin Microbial DNA Column. V další fázi byla provedena purifikace DNA promýváním, nejprve pomocí 500 µl BW pufru a poté 500 µl B5 pufru. Mezi každým promývacím krokem byl vzorek centrifugován (30 s, 11 000 × g) a umístěn do čisté zkumavky. Na závěr byla membrána obsahující navázanou DNA sušena centrifugací (30 s, 11 000 × g), aby došlo k odstranění zbytků promývacích pufrů. Finální fází byla eluce DNA, která byla provedena přidáním 50 µl BE pufru. Vzorek byl inkubován 1 minutu při pokojové teplotě a následně centrifugován 30 s při 11 000 × g. Eluční krok byl zopakován (od bodu přidání 50 µl BE pufru). Výsledné množství použitého elučního činidla činilo tedy 100 µl. Nakonec byl supernatant přenesen do sterilní mikrozukumavky a uchováván v teplotě -30 °C pro následné použití.

3.6 Polymerázová řetězová reakce

Za účelem amplifikace vybraných genů byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Složení PCR směsi uvádí tabulka 6. Potřebné objemy byly smíchány v mikrokumavce o objemu 100 μl . Testovány byly všechny primery uvedené v kapitole 3.2.2.1. Pro práci byl použit master mix OneTaq Hot Start a voda v PCR kvalitě. Současně se vzorky zkoumané DNA byla pro každý primer provedena také negativní kontrola (NK), která neobsahovala DNA, aby byla odhalena případná kontaminace. U genu *16S rRNA*, který potvrzuje prokaryotní původ DNA, byla provedena i kontrola pozitivní (PK) s pomocí známé DNA z bakteriálního druhu *Cupriavidus Necator* H16. Vše bylo připravováno sterilně v laminárním boxu. V závislosti na doporučené annealingové teplotě jednotlivých primerů byl nastaven teplotní profil PCR reakce (tabulka 7 a tabulka 8). Vzorky byly vyhodnocovány pomocí elektroforézy na agarosovém gelu.

Tabulka 6: Složení PCR směsi

Složka	Objem [μl]
Master mix	12,5
Primer	2 \times 1
DNA	1
H ₂ O	9,5

Tabulka 7: Teplotní profil PCR reakce pro geny *phaJ*, *phaP*, *padR*, *phaR*, *fabG*, *rpoD* a *16S rRNA*

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Trvání [s]
Počáteční denaturace	1	94	30
Denaturace	30	94	30
Hybridizace primerů		55	30
Elongace		68	90
Elongace	1	68	300
Ochlazení		30	60

Tabulka 8: Teplotní profil PCR reakce pro geny *phaC* a *recA*

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Trvání [s]
Počáteční denaturace	1	94	30
Denaturace	30	94	30
Hybridizace primerů		65	30
Elongace		68	90
Elongace	1	68	300
Ochlazení		30	60

Kromě klasické PCR byla provedena také gradientová PCR za účelem ověření annealingové teploty primeru pro gen *rpoD*. Celkem bylo do 100 μ l mikrozkušavek připraveno osm shodných vzorků se složením, které uvádí tabulka 6 a jedna negativní kontrola (NK). Polymerázová řetězová reakce byla provedena podle nastavení, které popisuje tabulka 9. Gradient teploty činil 2,125 $^{\circ}$ C. Negativní kontrola byla provedena v oblasti nejbližší odpovídající teoretické teplotě annealingu, tedy 54,25 $^{\circ}$ C.

Tabulka 9: Teplotní profil gradientové PCR reakce pro gen *rpoD* s teplotním gradientem 2,125 $^{\circ}$ C v kroku hybridizace primerů

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}$ C]	Trvání [s]
Počáteční denaturace	1	94	30
Denaturace	30	94	30
Hybridizace primerů		50–67	30
Elongace		68	90
Elongace	1	68	300
Ochlazení		30	60

3.7 Elektroforéza na agarosovém gelu

Detekce vzorků po klasické PCR byla prováděna pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Gel byl připravován pomocí TBE pufru (tris(hydroxymethyl)aminomethan 108 g/l; kyselina boritá 55 g/l; EDTA 9,3 g/l), který byl desetkrát zředěn. V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 150 ml TBE pufru s 1,8 g agarosy (1,2% agarosový gel). S pomocí mikrovlnné trouby byl roztok pětikrát povařen, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. Po ochlazení roztoku k němu bylo přidáno 7 μ l barviva Midori Green Advance. Směs byla přelita do připravené formy a ponechána úplně ztuhnout. Do jamek bylo následně pipetováno 10 μ l PCR produktu smíchaného s nanášecím pufrem. Pro porovnání byl do jedné jamky použit velikostní standard (4 μ l). Gel byl umístěn do nádoby pro elektroforézu a přelit desetkrát zředěným TBE pufrem, aby bylo zajištěno vodivé spojení. Separace probíhala při napětí 90 V, po dobu 30 minut. Nakonec byly vzorky vizualizovány pomocí UV detektoru.

3.8 Optimalizace kvantitativní polymerázové řetězové reakce

Směsi pro qPCR byly připravovány pomocí master mixů SYTO-9 qPCR 2x (dále jako SYTO) a LightCycler 480 SYBR Green (dále jako Roche). Poměry reagentů byly voleny na základě informací přiložených v každém z testovaných master mixů. Konkrétně byly optimalizované koncentrace DNA, primerů a hořčičných iontů ve výsledných roztocích.

Doporučená koncentrace DNA ve finální směsi se lišila v závislosti na použitém master mixu. V případě master mixu SYTO byl rozsah požadovaného množství poměrně široký, a to 0,5–500 ng DNA. Oproti tomu u master mixu Roche bylo požadované rozmezí 5–30 ng DNA. Významnou roli při amplifikaci hraje také koncentrace primerů. Výsledná koncentrace jednoho z páru primerů v reakční směsi byla doporučena v rozmezí 0,1 μ M až 1 μ M

v konečném objemu 25 μ l v případě master mixu SYTO a od 0,1 μ M do 0,3 μ M ve finálním objemu 20 μ l u mastre mixu Roche. Pro plnou funkci DNA polymerázy je vyžadována také přítomnost hořečnatých iontů, které působí jako kofaktor. Při použití master mixu SYTO byly ionty obsaženy přímo v master mixu (2,5 mM $MgCl_2$ v konečném reakčním objemu 25 μ l) a nebylo nutné je do směsi zvlášť přidávat. Naopak v master mixu Roche byly testovány různé koncentrace přidávaných Mg^{2+} iontů. Jejich výsledné koncentrace ve směsi se pohybovaly v rozmezí 1–3,25 mM.

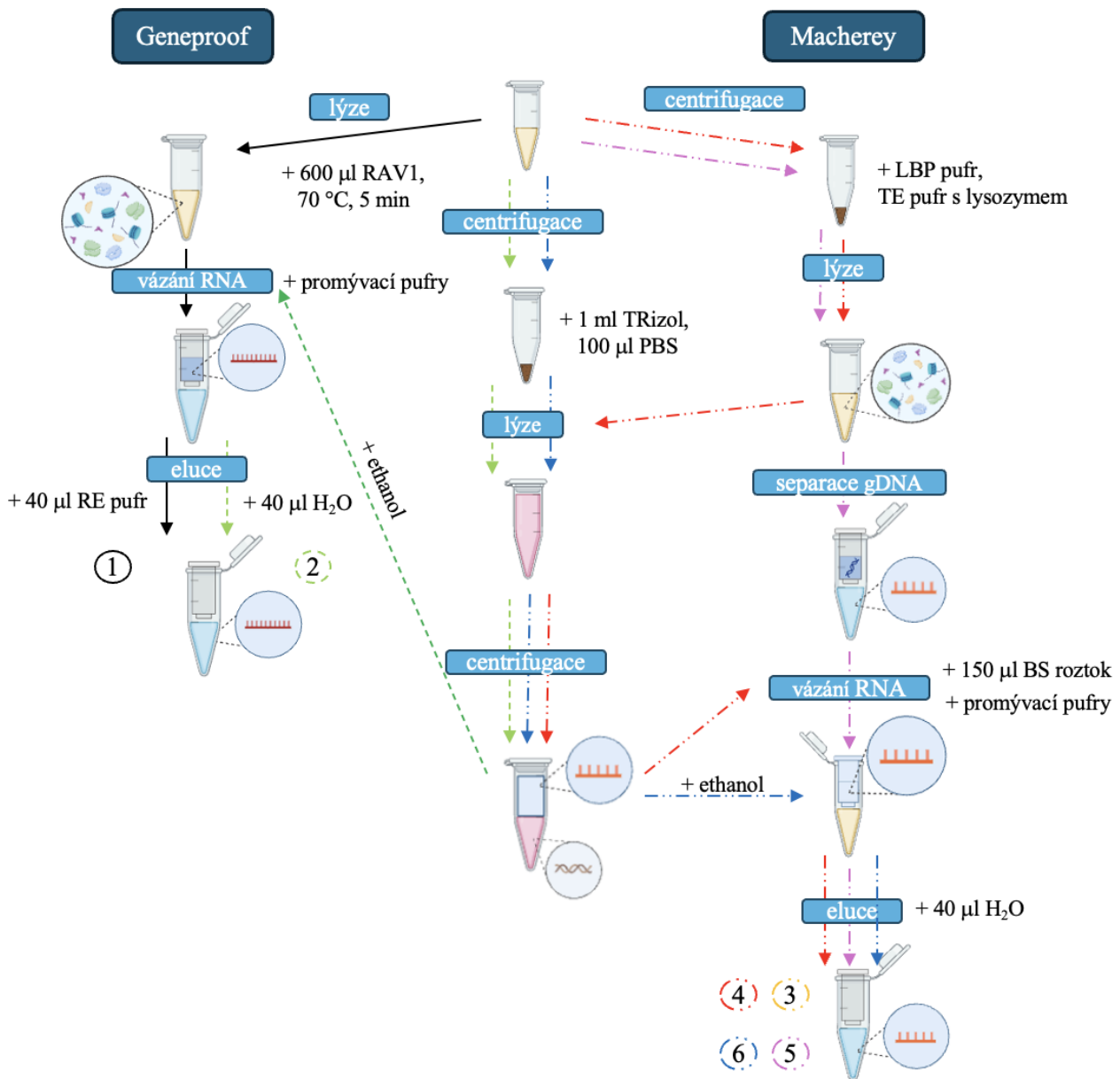
Všechny složky potřebné pro daný master mix byly smíchávány v mikrozkuvkách o objemu 100 μ l. U každého z použitých primerů byla připravována i NK neobsahující DNA templát. Takto připravené vzorky byly podrobeny qPCR s následnou analýzou křivek tání, jejichž teplotní profil uvádí tabulka 10. Signál byl automaticky detekován v průběhu analýzy díky měření stoupající intenzity fluorescence.

Tabulka 10: Teplotní profil qPCR s následnou analýzou křivek tání (HRM)

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [°C]	Trvání [s]
Počáteční denaturace	1	95	180
Denaturace	40	95	10
Hybridizace primerů		55	15
Elongace		72	10
HRM	1	95	15
		40	60
		95	15
Ochlazení	1	40	20

3.9 Izolace RNA

Izolace RNA byla prováděna s komerčními kity od společností Geneproof a Macherey. Kromě přiložených postupů byly také testovány určité modifikace, zejména v části lýze buněk a odstraňování kontaminantů. Celkem bylo provedeno 6 kombinací postupů, které schematicky znázorňuje obrázek 6. Všechny vzorky byly testovány vždy v duplikátech.



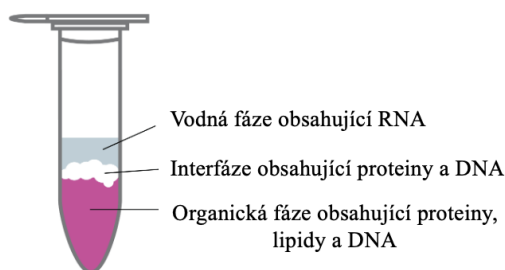
Obrázek 6: Schéma různých způsobů izolace RNA

3.9.1 Kit Geneproof

V prvním případě izolace pomocí kitu Geneproof bylo postupováno přesně podle přiloženého návodu. Do mikrozkušavky bylo odebráno 150 μl kultury, ke které bylo přidáno 600 μl pufru RAV1 obsahujícího Carrier RNA. Takto upravený vzorek byl inkubován v termobloku při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Následně bylo k lyzátu přidáno 600 μl 99,8% ethanolu. Po zvortexování bylo 700 μl získané směsi přeneseno na kolonku umístěné ve 2 ml centrifugační zkumavce. Pro navázání RNA na kolonku byl vzorek centrifugován 1 minutu při zrychlení 8 000 $\times g$. Po umístění kolonky do nové zkumavky byl nanesen i zbytek vzorku, který byl opět centrifugován za stejných podmínek. V následných krocích byla membrána promývána. V prvním kroku byly odstraněny kontaminanty a inhibitory PCR reakce pomocí 500 μl RAW pufru. Při dalším promývání bylo přidáno nejprve 600 μl a poté 200 μl pufru RAV3. Mezi každým promývacím krokem byl vzorek umístěn do nové zkumavky a centrifugován 1 minutu při 8 000 $\times g$. Před elucí byla membrána sušena v centrifuze 1 minutu při 11 000 $\times g$, aby došlo k odstranění veškerých reziduí promývacích pufrů. Na závěr byla RNA eluována. V případě jednoho vzorku pomocí RNase-free vody předehřáté na 70 $^{\circ}\text{C}$. Druhý vzorek z duplikátu byl eluován přiloženým RE pufrem opět při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$. Na kolonku bylo přidáno nejprve 20 μl elučního činidla. Po centrifugaci (11 000 $\times g$, 1 min) byl eluční krok zopakován opět přidáním 20 μl činidla, celkový objem tedy činil 40 μl . Takto izolované vzorky byly okamžitě zamrazeny v hlubokomrazícím boxu na teplotu -80 $^{\circ}\text{C}$, kde byly uschovány pro další použití.

3.9.2 Kit Geneproof s TRIzolem

Dalším způsobem byla modifikace počáteční fáze výše zmíněného postupu (lýze buněk a uvolnění RNA). V tomto případě bylo odebráno takové množství kultury, které po centrifugaci (4 000 $\times g$, 3 min) a odpipetování supernatantu odpovídalo 30–50 mg mokré biomasy. K němu byl přidán 1 ml TRIzolu. Vzorek byl ponechán inkubovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 100 μl 1-brom-3-chlor-propanu (BCP). Po 3 minutách inkubace při laboratorní teplotě byl vzorek centrifugován 15 minut na maximální otáčky a teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Během tohoto kroku došlo k oddělení fází, jak ukazuje obrázek 7. Z vodné fáze bylo odpipetováno 350 μl do předem připravené mikrozkušavky obsahující 350 μl ethanolu. Celý objem vzorku byl přenesen na kolonku přiloženou v kitu Geneproof. Kroky promývání, eluce a uchování byly provedeny podle návodu přiloženého v tomtéž kitu.



Obrázek 7: Rozdělení a obsah jednotlivých fází po centrifugaci při izolaci RNA pomocí TRIzolu, upraveno z [62]

3.9.3 Kit Macherey

V případě izolace pomocí kitu Macherey bylo nejprve do mikrozkušavky odebráno 150 μl kultury. Pro oddělení biomasy byl vzorek centrifugován při $6\,000 \times g$ po dobu 5 minut. Po odpipetování supernatantu byla biomasa rozsuspendována v 350 μl LBP pufru. Následně byla provedena enzymatická lýze vzorku pomocí přidání 100 μl TE pufru s lysozymem o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Takto připravený vzorek byl inkubován ve vodní lázni při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut a poté byl přenesen na kolonku Nucleospin gDNA Removal Column. Pomocí centrifugace ($11\,000 \times g$, 30 s) byla odstraněna gDNA. Dále bylo pracováno pouze s filtrátem, ke kterému bylo přidáno 150 μl BS roztoku. Celý objem byl přenesen na kolonku Nucleospin RNA Plus Column a centrifugován 15 s při $11\,000 \times g$, čímž došlo k navázání RNA. V dalších krocích byl vzorek promýván pomocí 200 μl pufru WB1, 600 μl pufru WB2 a 250 μl pufru WB2. Mezi každým krokem byl vzorek centrifugován ($11\,000 \times g$, 15 s) a umístěn do nové centrifugační zkumavky. Před elucí byla membrána sušena centrifugací 2 minuty při $11\,000 \times g$. Na závěr byla provedena eluce aplikací 40 μl ($2 \times 20\ \mu\text{l}$) RNase-free vody přehřáté na $70\text{ }^\circ\text{C}$ a centrifugací při $11\,000 \times g$ po dobu 1 minuty. Izolovaná RNA byla okamžitě zamrazena na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v hlubohomrazícím boxu. Zde byla také dále uchovávána pro další použití.

3.9.4 Kit Macherey v různých kombinacích s TRIzolem

Pro výše uvedený postup izolace s kitem Macherey byly dále zkoumány tři různé modifikace lišící se zejména ve způsobu lýze buněk a odstranění kontaminačních látek. Při těchto metodách byly využity následující kombinace původního postupu a TRIzolu.

V prvním případě byl pro rozložení buněk a uvolnění RNA aplikován pouze TRIzol. Byl tedy využit obdobný postup jako v případě izolace s kitem Geneproof v kombinaci s TRIzolem. Postup byl shodný až do fáze smíchání vodné fáze s ethanolem. Tento roztok byl ovšem přenesen na kolonku Nucleospin RNA Plus Column z kitu Macherey. Způsob promývání odpovídal postupu přiloženému v kitu Macherey. Eluce byla provedena aplikací dvakrát 20 μl RNase free vody při pokojové teplotě, celkový objem po eluci činil 40 μl . Mezi každým elučním krokem byl vzorek centrifugován ($11\,000 \times g$, 1 min).

Dále bylo v postupu s TRIzolem testováno zaměnění ethanolu využívaného při srážení RNA za BS pufr, který byl v originálním postupu využíván pro vázání RNA na kolonku. Až do kroku stáčení vzorku pro rozdělení fází bylo tedy postupováno obdobným způsobem jako v předešlých případech při práci s TRIzolem. Z vodné fáze bylo odebráno 350 μl vzorku, ke kterému bylo přidáno 100 μl BS roztoku. Následné kroky navázání na kolonku, promývání a eluce byly dokončeny podle postupu v kitu Macherey.

V posledním případě byly na kulturu aplikovány obě metody lýze buněk. V první fázi byla podle postupu v kitu Macherey enzymaticky narušena buněčná membrána pomocí TE pufru s lysozymem o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Po inkubaci byl na takto upravený vzorek aplikován TRIzol. Stejným způsobem jako v předešlých případech byly po centrifugaci vzorku získány dvě fáze. Nakonec bylo 350 μl fáze obsahující RNA smícháno se stejným množstvím 70% ethanolu a přeneseno na kolonku Nucleospin RNA Plus Column. Způsob promývání a eluce se nelišil od postupů zmiňovaných v předešlých odstavcích.

3.10 Reverzní transkripce mRNA na cDNA

Směs pro reverzní transkripci mRNA do cDNA (RT směs) byla připravena smícháním takového množství RNA, aby její se její výsledná koncentrace v roztoku pohybovala v rozmezí 1–100 ng/μl. Objem byl doplněn 2 μl náhodných hexamerních primerů a vodou v PCR kvalitě do celkového objemu 13 μl. Roztok byl homogenizován vortexováním, následně stočen a umístěn do termocycleru na 10 minut při teplotě 65 °C za účelem denaturace sekundárních struktur RNA. Následně byl vzorek ochlazen a doplněn o zbývající reagenty potřebné pro reverzní transkripci, jejichž přesné složení uvádí tabulka 11. Výsledný objem RT směsi činil 20 μl. Veškerá práce s jednotlivými reagenty i s celou RT směsí byla prováděna na ledu. Samotná reakce probíhala v termocycleru nejprve při teplotě 25 °C po dobu 10 minut a okamžitě poté 30 minut při teplotě 55 °C (doporučené nastavení pro cílové mRNA o velikosti menší než 4 kb). Na závěr byla inaktivována reverzní transkriptáza zahřátím vzorků na 85 °C po dobu 5 minut. Tímto postupem bylo dosaženo zisku cDNA v dostatečné kvalitě pro PCR, která byla skladována při teplotě -25 °C až do dalšího použití.

Tabulka 11: Přesné množství jednotlivých reagentů použitých pro reverzní transkripci

Složka	Množství [μl]
Pufr pro reverzní transkripci	4
Inhibitor RNáz	0,5
Deoxynukleotidy	2
Reverzní transkriptáza	0,5

3.11 Růstová křivka

Měření růstové křivky bylo prováděno na dvou typech produkčních médií, a to na NB médiu s 4 g/l glukózy a minerálním médiu s 10 g/l glukózy. Nejprve bylo připraveno inokulum podle postupu uvedeného v kapitole 3.4. Následná produkce probíhala v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml, do nichž bylo připraveno 100 ml média. Po sterilaci byla do média přidána glukóza, popřípadě roztok stopových prvků (u minerálního média). Před inokulací byla média temperována na 50 °C a následně byla zaočkována inokulačním poměrem 10 obj. %. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 50 °C a 160 rpm po dobu 72 hodin. V intervalech po 6 hodinách bylo měřeno pH a optická hustota, dále byly prováděny odběry pro gravimetrické stanovení biomasy, kvalitativní i kvantitativní stanovení PHA a pro izolaci RNA.

3.11.1 Gravimetrické stanovení množství biomasy

Pro gravimetrické stanovení biomasy bylo vždy odebíráno dvakrát 10 ml kultury do centrifugačních zkumavek. Po centrifugaci při 6 000 rpm po dobu 5 minut byl odlit supernatant. Stejný postup centrifugace byl proveden i při promytí biomasy destilovanou vodou. Nakonec byla biomasa sušena do konstantní hmotnosti a vážena na analytických vahách.

3.11.2 Odběry vzorků pro izolaci RNA

V průběhu měření růstové křivky byly odebírány také vzorky pro izolaci RNA. V závislosti na době odběru bylo odebíráno nejprve 600 μl , v pozdějších fázích kultivace byl objem postupně snižován až na 200 μl . V každé hodině byly z obou médií provedeny celkem čtyři odběry do 1,5 ml centrifugačních zkumavek. Všechny vzorky byly centrifugovány při 4 °C na maximální otáčky po dobu 15 minut. Po centrifugaci byl sterilně odpipetován supernatant. Biomasa byla uchována při -80 °C až do samotné izolace RNA.

3.11.3 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty

Spektrofotometricky byla měřena optická hustota při vlnové délce 630 nm. Měření bylo prováděno v květách o objemu 1 ml. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

3.11.4 Stanovení množství PHA pomocí plynové chromatografie

Ze suché biomasy bylo po jejím zvážení odebráno 5–11 mg do krimpovacích vialek pro stanovení PHA. Následně byl do vialek přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi s vnitřním standardem (15% kyselina sírová v methanolu, 5 mg/ml kyselina benzoová). Vše bylo hermeticky uzavřeno a esterifikováno při 94 °C po dobu tří hodin. Po skončení esterifikace byl celý obsah smíchán s 0,5 ml 0,05M hydroxidu sodného, aby došlo k neutralizaci kyseliny a oddělení fází. Do čisté šroubovací vialky bylo přidáno 900 μl isopropylalkoholu, do kterého bylo přidáno 50 μl odebrané chloroformové fáze (spodní). Takto připravené vzorky obsahující methylestery byly vyhodnoceny pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). K analýze byla použita kolona Stabilwax (Restek, délka 30 m, I.D. 0,32 mm, šířka filmu 0,5 μm) a jako nosný plyn dusík s konstantním průtokem 2 ml/min. Stejným způsobem byla pro každé měření připravena i kalibrační řada z čistých polymerů.

3.11.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Ve všech sledovaných fázích růstové křivky byla stanovována exprese genů *phaC*, *phaR*, *phaJ*, *fabG*, *phaR*, *phaP*, *padR* a *recA*. Pro jejich měření bylo nejprve nutné ověřit vhodnou koncentraci cDNA v reakční směsi. Získ této komplementární DNA (cDNA) z mRNA byl popsán již v kapitole o reverzní transkripci. Následně bylo nutné sestavit kalibrační přímky pro jednotlivé geny.

3.11.6 Porovnání koncentrace cDNA pro měření genové exprese

Při určování vhodné koncentrace cDNA v reakční směsi bylo porovnáváno množství získané z optimalizační části práce a doporučené množství z kitu pro reverzní transkripci. V prvním případě byly směsi připravované s cDNA zředěnou na koncentraci přibližně 100 ng/ μl . Druhou variantou bylo použití 1 μl neředěné cDNA získané přímo z reverzní transkripce mRNA s koncentrací cca 2500 ng/ μl . V obou případech byly směsi připravovány v duplikátech z 12,5 μl MM SYTO, 2 μl obou z dvojice primerů (výsledná koncentrace 0,4 μM) a voda do výsledného objemu 25 μl . Pro porovnání byly náhodně vybrány primery *PhaC* a *PadR*.

Reakce probíhala podle teplotního nastavení popsaného v kapitole o optimalizaci směsi na qPCR (tabulka 10).

3.11.6.1 Kalibrační křivky

Pro každý gen byla sestrojena kalibrační závislost s využitím příslušného primeru. Celkem bylo připraveno celkem pět koncentrací DNA. Jednotlivé vzorky byly připravovány v duplikátech s využitím nejprve neředěné DNA o výsledné koncentraci 100 ng/μl v reakční směsi. Toto množství bylo snižováno desítkovým ředěním až do desetitisíckrát zředěného vzorku. V každé směsi byl dále použit master mix SYTO (12,5 μl), primery o výsledné koncentraci 0,4 uM a voda na doplnění do objemu 25 μl. Teplotní profil reakce uvádí tabulka 10.

3.11.6.2 Měření genové exprese

Měření genové exprese pomocí qPCR bylo provedeno analýzou cDNA získaných z jednotlivých fází růstové křivky (způsob zisku cDNA uvádí předešlé kapitoly o izolaci RNA a její reverzní transkripci). Vzorky pro qPCR byl připravovány v duplikátech pro každý odběr. Do reakční směsi bylo přidáváno 12,5 MM SYTO, 1 μl cDNA získané přímo z reverzní transkripce, její koncentrace činila přibližně 2 500 ng/μl. U každého vzorku byly testovány všechny primery (PhaC, PhaJ, PhaP, PhaR, PadR, FabG a RecA). Vždy byly přidávány 2 μl každého z dvojice primerů. Jejich koncentrace ve finální směsi činila 0,4 uM. Výsledný roztok byl doplněn vodou v PCR kvalitě do celkového objemu 25 μl. Analýza probíhala podle nastavení, které uvádí tabulka 10.

4 Výsledky a diskuse

Myšlenka udržitelnosti a ekologie vede vědce k vývoji nových technologií a materiálů. Jednou z oblastí výzkumu jsou také polyhydroxyalkanoáty, látky mikrobiálního původu s potenciálem nahradit petrochemické plasty. V posledních letech se ukazuje, že se zástupci rodu *Aneurinibacillus* jeví jako vhodní kandidáti pro jejich produkci. Unikátnost tohoto rodu spočívá především v široké paletě různých netypických kopolymerů, které jsou schopni syntetizovat. Většina experimentů se zaměřuje především na produkci a vlastnosti získaných kopolymerů [49, 47, 64]. Avšak pro lepší pochopení jejich syntézy je potřeba zkoumat i genetický základ tohoto organismu, jehož pochopení by otevřelo možnosti například genovému inženýrství. Za tímto účelem byla prováděna experimentální část práce, ve které byly zkoumány jednotlivé geny spojené s metabolismem PHA a jejich exprese.

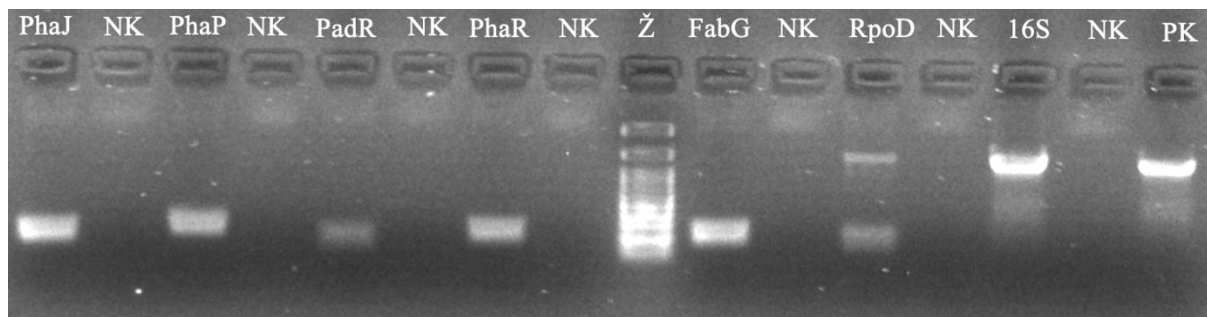
4.1 Optimalizace

4.1.1 Testování primerů pro PCR

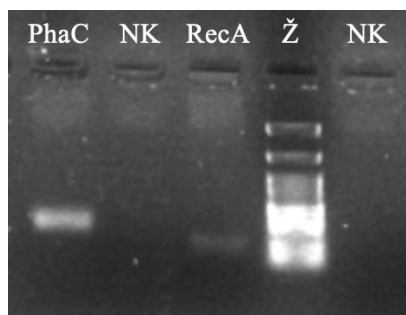
Všechny dříve popsané primery (kapitola 3.2.2.2) používané v práci byly navrženy na bakteriální rod *Aneurinibacillus*. Před jejich dalším použitím bylo ovšem nutné nejprve ověřit specifitu jejich hybridizace s DNA izolovanou z druhu *Aneurinibacillus* sp. AFn2.

Úspěšnost izolace a kvalita DNA pro účely PCR byla ověřena porovnáním typicky prokaryotního genu *16S rRNA* (16S) s pozitivní kontrolou (PK), jíž byla DNA izolovaná z druhu *Cupriavidus necator* H16, známého bakteriálního producenta PHA. Jak ukazuje obrázek 8, pozice obou bandů je shodná, což potvrzuje pozitivní výsledek izolace DNA. Oproti ostatním pozorovaným amplikonům se oba bandy nacházejí značně blíže počáteční linii. To vypovídá o velikosti tohoto genu – přibližně 1500 bp.

U ostatních genů byly předpokládány kratší výsledné produkty (cca 150–300 bp), proto je jejich poloha na gelu dále od počátečních jamek. Specifická hybridizace, a tedy vznik pouze jednoho PCR produktu byl úspěšně potvrzen u všech párů primerů kromě *RpoD*, což demonstruje obrázek 8 a obrázek 9. V pozitivních případech byl u každého z genů patrný pouze jeden band. V případě *RpoD* byly detekovány bandy dva, proto byla pro tento primer dále zkoumána optimální teplota annealingu, která bude diskutována v následující kapitole.



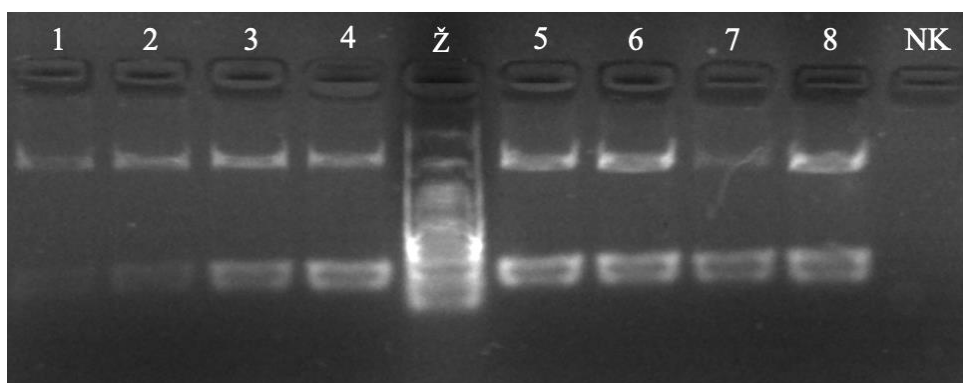
Obrázek 8: Výsledek gelové elektroforézy s PCR produkty genů *phaJ*, *phaP*, *padR*, *phaR*, *fabG*, *rpoD* a *16S rRNA*, NK – negativní kontrola (napravo pro každý primer), Ž – žebříček, PK – pozitivní kontrola



Obrázek 9: Výsledek gelové elektroforézy s PCR produkty genů *phaC* a *recA*, NK – negativní kontrola (napravo pro každý primer), Ž – žebříček

4.1.2 Teplotní nastavení annealingu

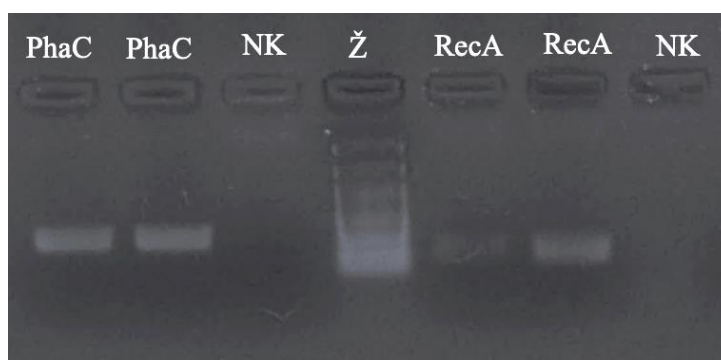
Kromě samotné sekvence primeru, která musí být vhodná pro studovaný gen, ovlivňuje jeho hybridizaci také teplota. Obrázek 8 zobrazuje kromě specificky amplifikovaných produktů také neúspěšný výsledek amplifikace genu *rpoD*, při němž byly na gelu vizualizovány dva bandy. Jelikož negativní kontrola pro tento vzorek (NK vpravo od RpoD) neobsahuje žádný band, je možné vyloučit jeho kontaminaci jinou molekulou DNA. Pravděpodobně tak v důsledku nedostatečné specifity primerů došlo během annealingové fáze polymerázové řetězové reakce k jejich hybridizaci na různých místech DNA. Po elongaci nového řetězce byly tedy získány různě dlouhé úseky, které po separaci gelovou elektroforézou vytvořili dva bandy. Jeden s očekávanou velikostí přibližně 180 bp a druhý s velikostí cca 1 600 bp. Z toho důvodu byla pro primer RpoD provedena gradientová PCR. Jejím cílem bylo stanovit optimální teplotu, při které dochází ke specifickému navázání primeru, nebo v opačném případě potvrdit nespecifitu primeru. Rozsah teplot byl zvolen 50–67 °C s gradientem 2,125 °C. Tímto teplotním profilem byla prověřena blízká oblast teoreticky stanovené annealingové teploty. Současně byla při teplotě 58,5 °C provedena negativní kontrola, která neobsahovala DNA. Jak ukazuje obrázek 10, při žádné teplotě nebylo dosaženo pozitivního výsledku v podobě jednoho bandu.



Obrázek 10: Výsledek gelové elektroforézy s produkty gradientové PCR pro primer RpoD; zvolený rozsah teplot 50–67 °C s gradientem 2,125 °C; označení jamek 1–8 odpovídá jednotlivým teplotám (sestupně – jamka 1 s produkty při 67 °C, jamka 8 s produkty při 50 °C)

V souvislosti s experimentální částí práce byl právě *rpoD* zvažován jako potenciální housekeeping gen. Pokud by se jednalo o gen se stabilní expresí, bylo by ho možné využít při kvantifikaci exprese ostatních genů. Nespecifické navázání primerů ovšem brání jeho aplikaci v dalších fázích experimentu, proto byl na základně získaných výsledků vyřazen. Vznik více PCR produktů ovšem neznamená, že v buňce gen není přítomen a nedochází k jeho expresi. Nese totiž informaci o sigma faktoru RNA polymerázy, který je nezbytný pro proces transkripce.

V rámci zefektivnění práce byla u primerů s vyšší annealingovou teplotou (PhaC a RecA; 65 °C) testována také nižší annealingová teplota 55 °C, která byla využívána u ostatních primerů. Ze získaných výsledků, které zobrazuje obrázek 11, je zřejmé, že i při této teplotě došlo k přesné hybridizaci primerů a zisku specifických produktů. Díky této skutečnosti je možné analyzovat všechny dříve zmíněné geny během jedné PCR.



Obrázek 11: Výsledek gelové elektroforézy s PCR produkty genů *phaC* a *recA* při annealingové teplotě 55 °C, NK – negativní kontrola (napravo pro každý primer), Ž – žebříček

Tabulka 12 shrnuje pro přehlednost získané výsledky ověřování specifity jednotlivých primerů a jejich finální annealingovou teplotu vycházející z dat získaných pomocí klasické PCR.

Tabulka 12: Shrnutí výsledků klasické PCR

Gen	Primer	Potvrzení specifity	Výsledná annealingová teplota [°C]
<i>phaJ</i>	PhaJ	ano	55
<i>phaP</i>	PhaP	ano	55
<i>padR</i>	PadR	ano	55
<i>phaR</i>	PhaR	ano	55
<i>fabG</i>	FabG	ano	55
<i>phaC</i>	PhaC	ano	55
<i>rpoD</i>	RpoD	ne	-
<i>recA</i>	RecA	ano	55
<i>16S rRNA</i>	16S	ano	55

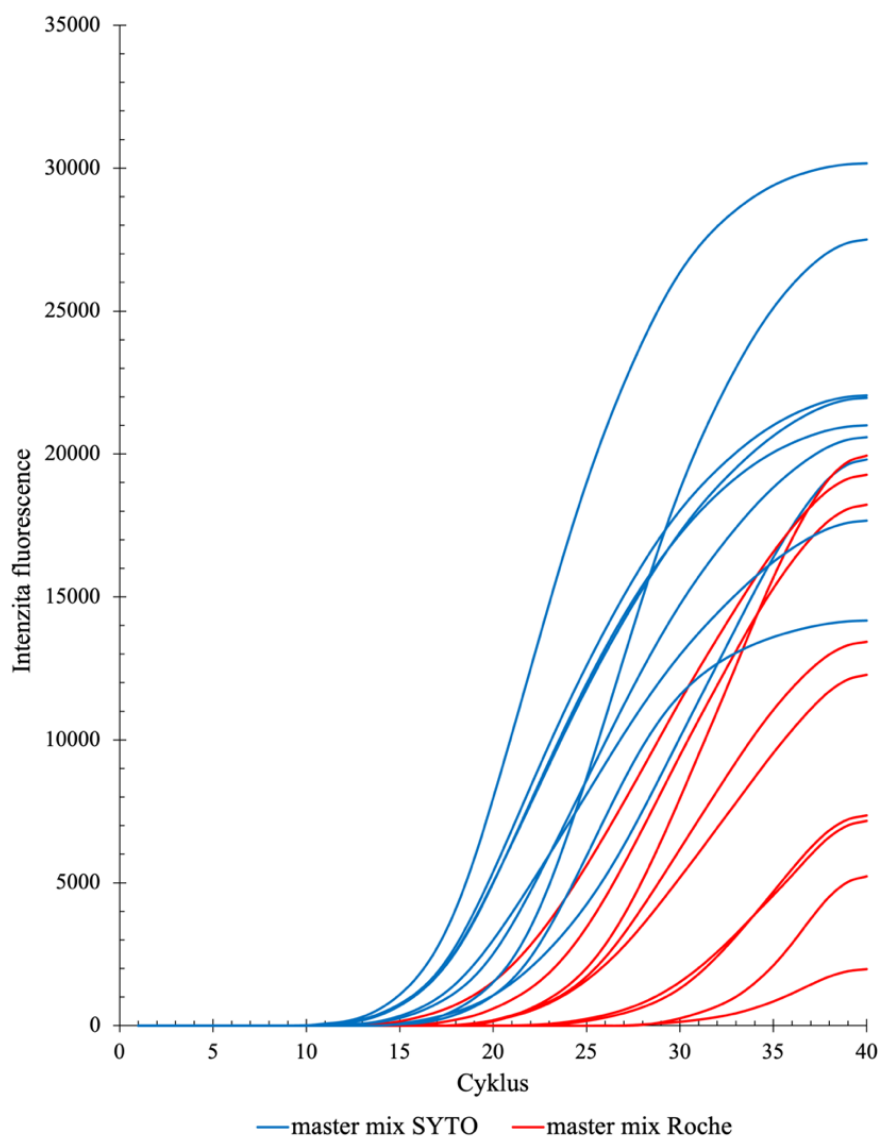
4.1.3 Složení směsi pro qPCR

V počáteční fázi práce byly testovány a porovnávány master mixy na přípravu qPCR směsí od dvou společností, a to SYTO a Roche. Pro dosažení pozitivních výsledků bylo nutné ověřit potřebné množství jednotlivých reagentů.

Jednou ze základních složek směsi je templátová DNA. Ta musí dosahovat požadované kvality z hlediska čistoty, koncentrace a nepřítomnosti inhibitorů, což bylo ověřeno již pomocí klasické PCR. Významnou roli při amplifikaci hraje také koncentrace jednotlivých primerů. Optimální množství primeru je nejnižší možné, které stále poskytuje pozitivní výsledky s ohledem na intenzitu signálu a rychlost reakce. Příliš nízká koncentrace vede k brzkému vyčerpání primerů, jenž znemožňuje amplifikaci všech molekul DNA v pozdějších fázích reakce. Naopak příliš vysoká koncentrace může způsobovat nespecifické hybridizace nebo dimerizaci primerů, což opět snižuje efektivitu qPCR. Syntéza nových kopií DNA je možná pouze za přítomnosti DNA polymerázy, která je svou funkcí závislá na hořčnatých iontech působících jako kofaktor [64].

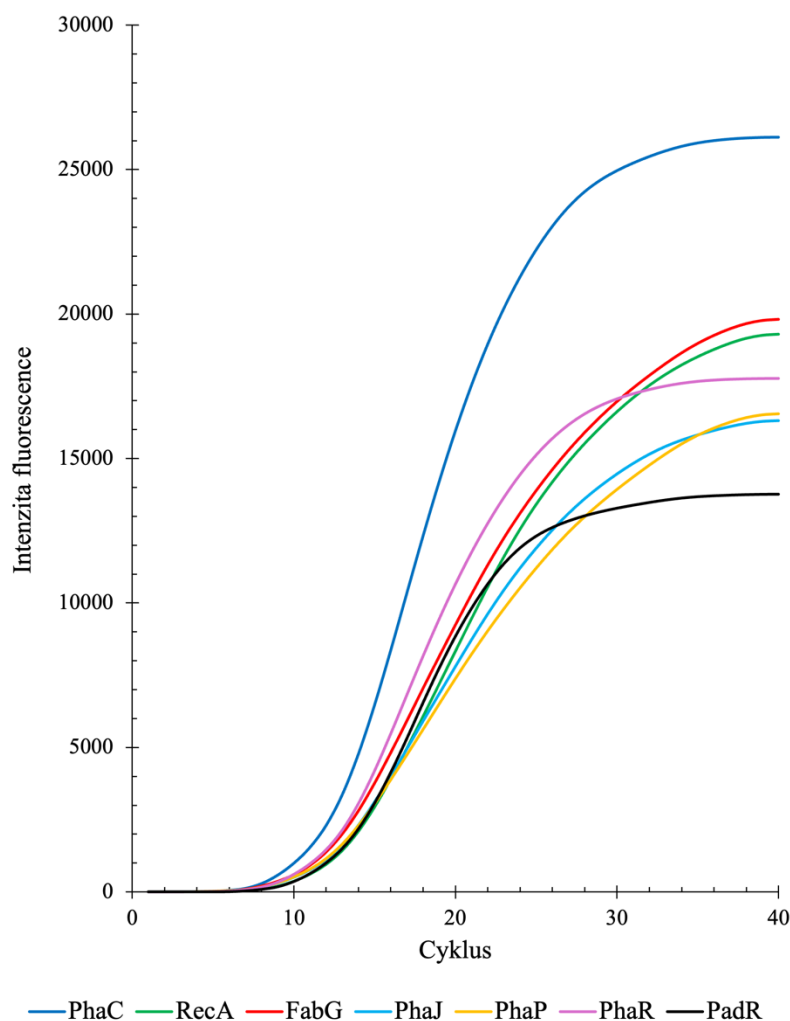
Kromě dalších esenciálních složek musí směs obsahovat fluorescenční barvivo umožňující měření signálu. Při použití master mixu Roche bylo využíváno barvivo SYBR I Green a v případě master mixu SYTO se jednalo o SYTO-9. Obě fluorescenční barviva řadíme mezi interkalační činidla se zvýšenou emisí při navázání na dsDNA. Spektra obou barviv jsou si velmi blízká, proto je možná jejich detekce pomocí shodných optických filtrů během jedné analýzy [66].

Na základě těchto poznatků a doporučených rozmezí koncentrací pro jednotlivé reagenty (uvedeno v kapitole o optimalizaci směsi na qPCR) byly provedeny testy různých kombinací koncentrací DNA, hořčnatých iontů (pouze pro master mix Roche) a primerů (v optimalizační fázi bylo pracováno pouze s vybranými primery). Podle získávaných výsledků byly dále vybírány a testovány nejvhodnější kombinace pro každý z master mixů. Po vyhodnocení konečných dat bylo ze všech testovaných možností dosaženo obecně lepších výsledků se vzorky připravovanými pomocí master mixu SYTO. A to zejména z pohledu intenzity maximálního signálu a cyklu, ve kterém byl signál detekován. Oproti tomu master mix Roche dosahoval ve svém maximu pouze průměrné intenzity master mixu SYTO. Fluorescenční barvivo využívané v master mixu Roche (SYBR Green I) může za neoptimalizovaných podmínek vykazovat v analýze inhibiční účinky [68], což mohlo negativně ovlivňovat intenzitu signálu. Inhibiční vlastnosti barviva SYBR Green I lze do jisté míry omezit přidávkem vyšší koncentrace hořčnatých iontů [66]. To bylo v průběhu experimentů také potvrzeno ziskem silnějších signálů při použití hořčnatých iontů v koncentracích 2,5–3,5 mM. Příklad amplifikačních křivek s nejlepšími výsledky pro oba master mixy znázorňuje obrázek 12.



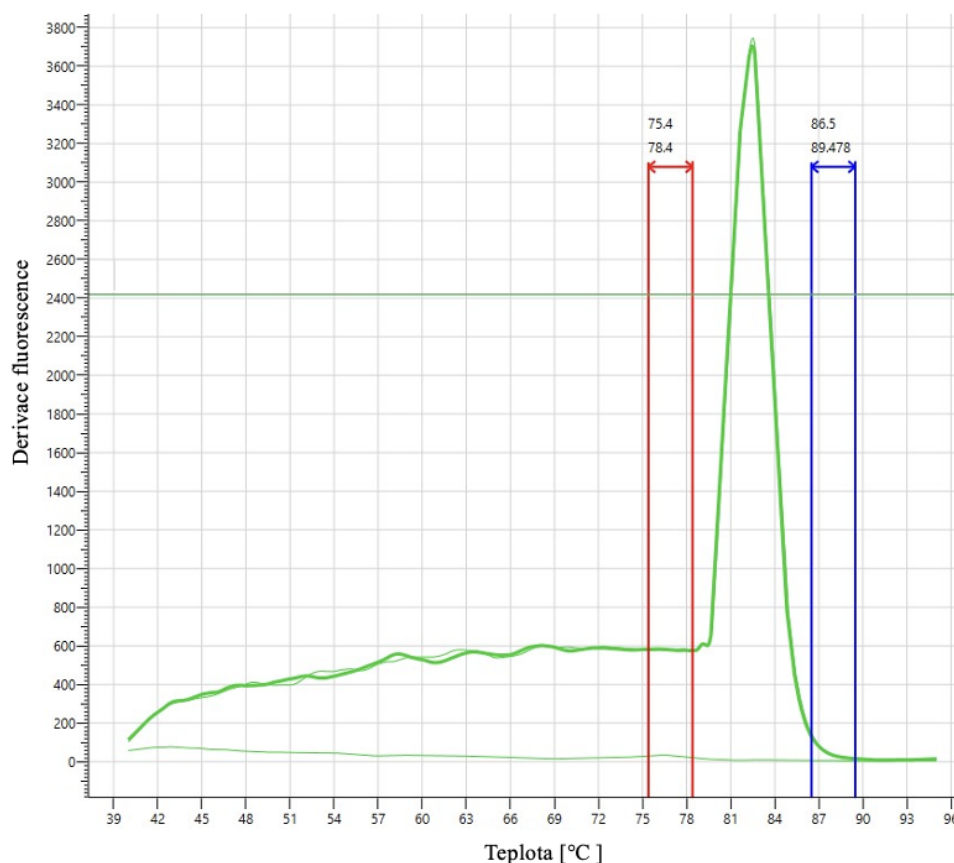
Obrázek 12: Ukázka nejlepších výsledků intenzit signálu s použitím master mixu SYTO (modrá) a Roche (červená)

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo konkrétně při použití master mixu SYTO s DNA o koncentraci 100 ng/μl a primerem PhaC o konečné koncentraci 0,4 uM každého z páru. Následně bylo toto množství aplikováno i při qPCR s ostatními primery, aby byla ověřena jejich funkčnost při zvolené koncentraci reagentů. I přes to, že nebylo složení reakční směsi dále optimalizováno pro jednotlivé primery, byla na základě získaných dat potvrzena dostatečná kvalita signálu u každého ze vzorků, jak ukazuje obrázek 13. Bez dalších úprav bylo tedy možné použít tuto kombinaci i v souvislosti s měření genové exprese.



Obrázek 13: Amplifikační křivky pro jednotlivé primery při použití MM SYTO s nevhodnější kombinací koncentrací složek směsi

Kontaminace vzorků byla vyloučena na základě vyhodnocení negativních kontrol, ve kterých nedocházelo k žádné amplifikaci. Současně byla provedena i analýza křivek tání (HRM analýza), za účelem odhalení vzniku nespecifických produktů jako jsou například dimery primerů. Tato metoda je založena na vyhodnocování teploty tání (T_t) čili teploty, při které se přemění polovina dsDNA na ssDNA. Vlivem změny struktury klesá intenzita fluorescence, která je zaznamenávána právě v závislosti na teplotě. Po derivaci vzniká v oblasti T_t pík, jehož poloha na ose x odpovídá konkrétnímu produktu. Pro čisté vzorky by mělo být dosaženo vzniku pouze jednoho píku na křivce tání produktu a nulového signálu v případě negativní kontroly [68], což je znázorněno na příkladu primeru PhaC, který zobrazuje obrázek 14. Při analýze odlišných produktů se vlivem různých sekvencí poloha píků liší. Velký význam má HRM analýza při vyhodnocování negativních kontrol. Díky vysoké citlivosti lze odhalit i drobnou kontaminaci, která nedosahuje dostatečného signálu, aby byla zaznamenána v měřítku amplifikačních křivek hlavních produktů.



Obrázek 14: Příklad výsledku HRM analýzy pro primer PhaC, tmavší křivka s píkem odpovídá specifickému produktu a světlejší křivka negativní kontrole

4.2 Porovnání metod izolace RNA pomocí komerčních kitů

Pro měření genové exprese je nutné z buněk izolovat mRNA. V této práci bylo testováno celkem šest různých postupů izolace RNA pracující především s izolačními kity Macherey, Geneproof a chemickým roztokem pro izolaci nukleových kyselin TRIzolom.

Jednotlivé metody izolace se lišily zejména ve způsobu lýze buněk a separaci uvolněné RNA z roztoku. Ve všech případech byla finální purifikace RNA prováděna promýváním vhodnými pufrů na kolonce. Tím došlo k odstranění všech kontaminantů negativně ovlivňujících další využití izolátu. Během purifikace musela být odstraněna také veškerá rezidua DNA, která by při PCR mohla poskytovat falešně pozitivní výsledky. V poslední fázi bylo testováno množství elučního činidla, které bylo sníženo z doporučených 60 μ l na 40 μ l za účelem zvýšení koncentrace RNA v izolátu. Navíc byla také porovnávána RNase free voda a RE pufr pro eluci v kitu Geneproof. Obě metody dosahovaly shodných výsledků a pro další použití byla jako eluční činidlo zvolena voda.

U všech vzorků byla spektrofotometricky měřena koncentrace a čistota. Získané výsledky uvádí tabulka 13. S využitím spektrofotometrie se do získané koncentrace propisují všechny složky absorbující při stejné vlnové délce. Pro měření nukleových kyselin je využívána vlnová délka 260 nm, ve které absorbují purinové a pyrimidinové kruhy bází. Do výsledné koncentrace tedy vstupuje příspěvek RNA, DNA a volných nukleotidů. Při hodnocení přesnosti výsledků je nutné zohlednit také čistotu vzorků určenou z poměru absorbancí při různých vlnových

délkách a také elektroforeticky [68]. Jednoznačně nejlepších výsledků z pohledu celkové koncentrace dosahovala izolace pomocí kitu Geneproof bez jakékoli modifikace, u které byla při přípravě vzorků využívána Carrier RNA. Tato látka slouží jako nosič pro precipitovanou RNA a napomáhá jejímu vázání na kolonku. V takto připravených vzorcích byla koncentrace RNA mnohonásobně vyšší než u jakékoli jiné metody.

Při spektrofotometrickém vyhodnocování čistoty vzorků byl porovnáván poměr A260/A280, který udává především míru kontaminace proteiny. Je však ovlivněn i přítomností fenolu, inhibitorů nukleáz a degradací vzorku. Čistá RNA by měla dosahovat hodnot tohoto poměru přibližně dva (v případě vyššího zastoupení uracilu mírně vyšší) [68]. U všech vzorků izolovaných pomocí TRIzolu byl získaný poměr značně nižší (přibližně 1,3–1,45), což vypovídá o přítomnosti kontaminantů silně absorbujících při 280 nm.

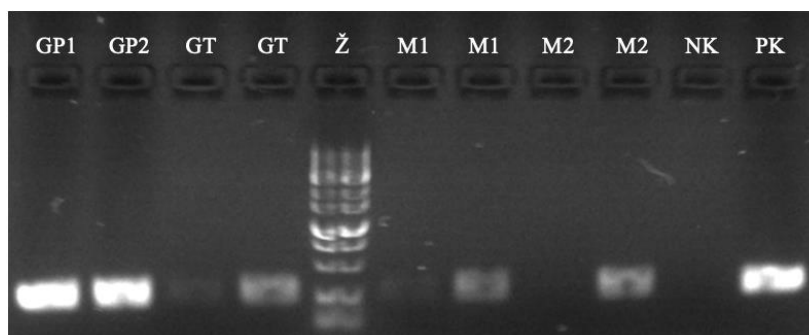
Poměr A260/A230 udává především míru kontaminace nízkomolekulárními látkami, jako jsou organické soli nebo uhlovodíky. V ideálním případě čisté RNA by měl výsledek nabývat vyšších hodnot než dva. Metody, ve kterých byl používán TRIzol, dosahovaly opět nižších výsledků. To vypovídá o možné přítomnosti kontaminantů jako například guanidin isothiokyanát nebo fenol obsažených v TRIzolu. Další vliv by mohla mít také rezidua ethanolu ze srážení RNA [69].

Tabulka 13: Koncentrace a čistota RNA pro uvedené způsoby izolace

Kit	Macherey				Geneproof	
	enzymatická	TRIzol	TRIzol	enzymatická a TRIzol	tepelná	TRIzol
Způsob lýze	enzymatická	TRIzol	TRIzol	enzymatická a TRIzol	tepelná	TRIzol
Srážení RNA	BS roztok	ethanol	BS roztok	ethanol	ethanol	ethanol
c RNA [ng/μl]	32,9	8,5	24,8	30,4	267,9	11,3
A260/A280	1,89	1,38	1,33	1,40	3,41	1,44
A260/A230	2,34	0,62	0,66	0,67	2,69	0,56

Pro vyloučení kontaminace izolátů genomickou DNA byla provedena také PCR s RNA namísto DNA, konkrétně s využitím primerů PhaC, který slouží k detekci PHA syntázy čtvrté třídy typické pro rod *Aneurinibacillus*. Jelikož je tato metoda založena pouze na amplifikaci úseků DNA, nemělo by k reakci vůbec docházet, což bylo také úspěšně potvrzeno pomocí vizualizace gelovou elektroforézou.

Po převedení izolované mRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce byla se získanými vzorky opět provedena klasická PCR za účelem ověření správného průběhu přepisu. Jak zobrazuje obrázek 15, nejlepších výsledků bylo dosaženo s kitem Geneproof (GP1 a GP2). V ostatních případech nebyly výsledky replikovatelné.



Obrázek 15: Ověření přítomnosti cDNA pomocí PRC a následné gelové elektroforézy, cDNA byla získána reverzní transkripcí mRNA izolované různými způsoby: GP1– Geneproof eluovaný vodou, GP2 – Geneproof eluovaný RE pufrem, GT – Geneproof a TRIzolu, M1– kitem Macherey v kombinaci s TRIzolem a lysozymem, M2 – kit Macherey v kombinaci s TRIzolem a BS roztokem

Navzdory určení kitu Geneproof pro izolaci virové RNA byl vybrán pro zbytek experimentální práce, a to na základě vysoké koncentrace izolátu, nepřítomnosti gDNA a dobré reprodukovatelnosti při reverzní transkripci. Navíc práce s tímto kitem byla velmi intuitivní a jednoduchá v porovnání s kitem Macherey.

4.3 Růstová křivka

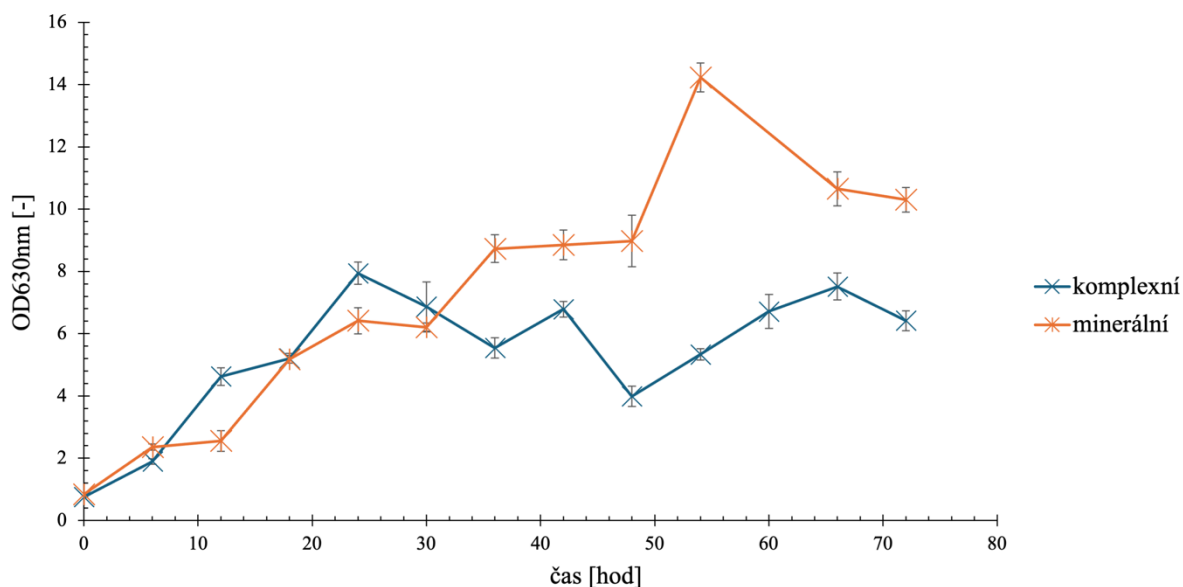
Jak již bylo dříve zmíněno rod *Aneurinibacillus* je jedním z producentů PHA. Jeho význam spočívá především v možnosti zpracování různých prekurzorů a jejich přeměnu v netypické kopolymery. Další zkoumanou zvláštností tohoto organismu je jeho schopnost produkce PHA v prostředí limitace živinami i bez ní. Právě na tuto skutečnost byla zaměřena pozornost během experimentální části práce, v rámci které byla pozorována růstová křivka na dvou typech kultivačních médií. Prvním bylo minerální médium, jenž svým složením reprezentovalo prostředí s limitací dusíkem. Jako zdroj uhlíku a současně prekurzor pro tvorbu PHA byla přidána glukóza s výslednou koncentrací 10 g/l. Takto nastavené podmínky vyvolávají stres, čímž je všeobecně podporována produkce PHA v mnoha organismech [69]. Druhým zkoumaným příkladem bylo prostředí s komplexním zdrojem živin připravené z NB média obohaceného glukózou o výsledné koncentraci 4 g/l. V tomto případě by nemělo docházet k vyvolávání stresu a vliv snadno dostupných živin by měl vést k vysokému nárůstu kultury.

4.3.1 Stanovování optické hustoty

Během kultivačních experimentů byl po dobu 72 hodin sledován růst biomasy na výše popsáných médiích. Orientačním stanovením nárůstu buněk bylo spektrofotometrické měření optické hustoty (OD) při 630 nm v intervalech šesti hodin.

Výsledky měření OD na obou médiích zobrazuje obrázek 16. Ze získaných dat lze odhadovat průběh nárůstu biomasy, nikoli však přesný počet buněk nebo jejich koncentraci. Naměřené hodnoty by měly v ideálním případě korelovat s růstovou křivkou a kopírovat její S tvar. V počáteční fázi kultivace nebyla zaznamenána významná lag fáze, ve které by docházelo k adaptaci buněk na nové prostředí. Lze tedy předpokládat, že tato fáze byla díky nastaveným podmínkám redukována. Od počátku měření byl tedy v obou médiích pozorován nárůst kultury. V případě NB média docházelo k růstu kultury přibližně do 24. hodiny kultivace. Následovala

fáze stacionární, a to až do ukončení experimentu. V případě minerálního média byla růstová fáze pozorována až do 54. hodiny, následně hodnota optické hustoty klesla, což by mohlo signalizovat přechod do stacionární fáze růstu. K potvrzení tohoto předpokladu by bylo potřeba prodloužit dobu kultivace, aby bylo získáno více dat udávající tento trend. Ani v jednom případě nebylo pozorováno významné snížení optické hustoty signalizující odumírání buněk.



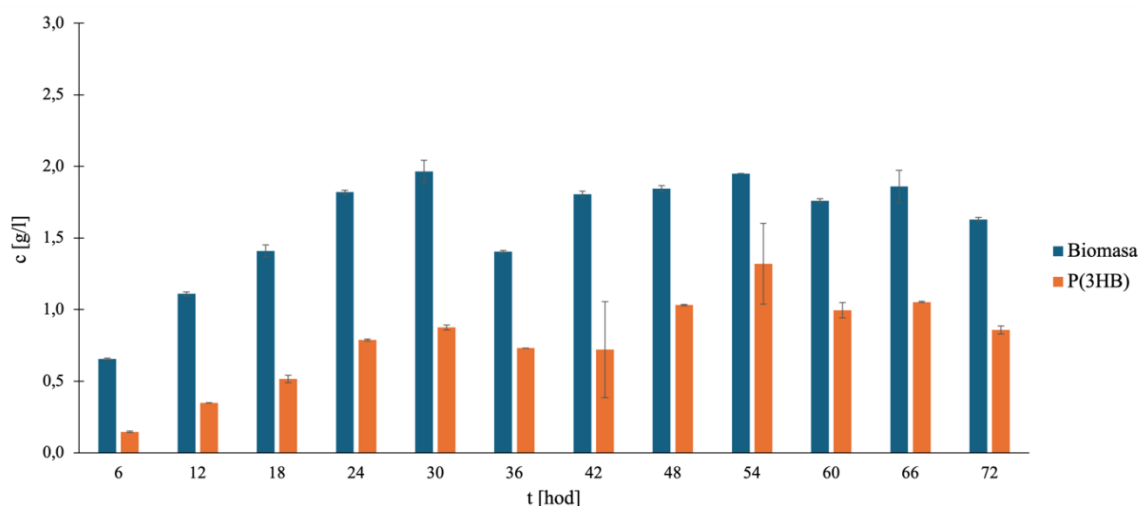
Obrázek 16: Vývoj optické hustoty na komplexním a minerálním médiu

4.3.2 Stanovení biomasy a PHA

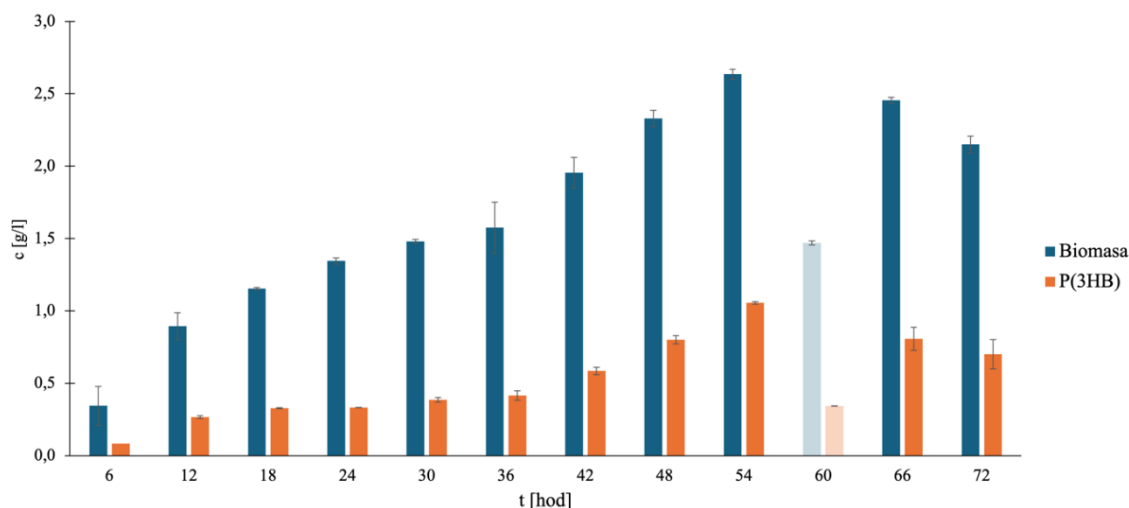
Přesná koncentrace buněk během kultivace byla určována gravimetricky. Současně bylo pomocí GC-FID stanovováno i množství PHA produkovaných v průběhu růstu. Konkrétně se jednalo o P(3HB). Výtěžek biomasy a P(3HB) na komplexním médiu (NB médiu) vystihuje obrázek 17. Naopak výtěžky na minerálním médiu shrnuje obrázek 18. Z pohledu koncentrace biomasy je pozorován podobný rostoucí trend na obou médiích až do třicáté hodiny kultivace. Zajímavým faktem je překvapivý nárůst biomasy na minerálním médiu, ve kterém se stoupající trend držel až do padesáté čtvrté hodiny. Naopak v médiu komplexním přešla kultura do stacionární fáze již po třicáté hodině. Významný vliv na tento výsledek mohla mít počáteční koncentrace glukózy v obou médiích, kdy vyšší koncentrace glukózy podpořila růst.

Při pohledu na produkci PHA je zřejmé, že na komplexním médiu docházelo k vyšší produkci PHA v poměru ke koncentraci biomasy. V podmínkách s limitací živin (minerální médium) tvořil P(3HB) přibližně 25–40 % hmotnosti suché biomasy. Naopak na komplexním médiu bylo dosaženo produkce 30–70 %. V budoucnosti by bylo vhodné porovnat kultivaci bakterie *Aneurinibaillus sp.* AFn2 také na komplexním médiu s obohacením glukózou o výsledné koncentraci 10 g/l. Takovými podmínkami by mohlo být dosaženo vyššího nárůstu kultury při zachování obdobného procentuálního zaplnění buňky PHA granulemi.

I přes rozdílné zastoupení PHA byla jejich produkce potvrzena v obou médiích. Z čehož lze usoudit, že bakterie *Aneurinibaillus sp.* AFn2 nevyžaduje pro produkci PHA limitaci živinami. Naopak dokáže produkovat PHA i v prostředí s dostatečným množstvím živin, a to za zisku vyšších procentuálních výtěžků.



Obrázek 17: Výtěžek biomasy a P(3HB) na NB médiu s koncentrací glukózy 4 g/l



Obrázek 18: Výtěžek biomasy a P(3HB) na minerálním médiu s koncentrací glukózy 10 g/l, výsledek ze 60 hodiny nebyl zahrnut

4.3.3 Izolace RNA a její přepis do cDNA

Pro studium genové exprese bylo nutné z bakteriálních buněk izolovat RNA. V závislosti na výsledcích optimalizační části práce byl pro izolaci zvolen kit Geneproof. Koncentrace a čistota byly měřena spektrofotometricky. Získané výsledky uvádí tabulka 14. Koncentrace jednotlivých izolátů z komplexního média se pohybovala v průměru kolem 330 ng/μl. Všechny vzorky dosahovaly poměru A260/A280 vyšší než 3, což vylučuje jejich kontaminaci proteiny. Hodnoty poměru A260/A230 indikující znečištění organickými látkami byly v některých případech pozdější fáze kultivace nižší než 2. Tato skutečnost nasvědčuje možné kontaminaci nízkomolekulárními organickými látkami. V úvahu připadají například peptidy obsažené v médiu nebo samotný 3(HB), který se zvyšující se koncentrací v čase mohl znesnadňovat purifikaci RNA.

Výsledky koncentrace a čistoty RNA získané izolací z buněk rostoucích na minerálním médiu zobrazuje tabulka 14. Koncentrace RNA je v tomto případě mírně vyšší než na komplexním, protože koncentrace buněk na minerálním médiu byla vyšší. I v případě

minerálního média dosahoval poměr A260/A280 hodnoty vyšších než 3, což vylučuje kontaminaci proteiny. Oproti NB médiu dosahovala RNA izolovaná z buněk rostoucích na minerálním médiu lepších výsledků z pohledu poměru A260/A230. U většiny vzorků bylo dosaženo hodnoty vyšší než 2, což vypovídá o dostatečné čistotě izolátů [69].

Tabulka 14: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA izolované z jednotlivých médií v průběhu měření růstové křivky

Hodina	Komplexní médium				Minerální médium			
	Vzorek	c RNA [ng/μl]	A260 /A280	A260 /A230	Vzorek	c RNA [ng/μl]	A260 /A280	A260 /A230
6	a	531,0	3,03	2,65	1	456,5	3,18	1,50
	b	639,9	3,06	3,02	2	461,7	3,11	2,36
12	c	410,3	2,97	2,90	3	393,9	3,08	1,67
	d	385,3	3,02	2,95	4	390,2	3,10	2,04
18	e	428,0	3,15	1,59	5	605,0	3,20	3,25
	f	324,3	3,04	0,95	6	524,5	3,12	2,80
24	g	240,0	3,22	0,94	7	368,8	3,23	2,77
	h	239,3	3,12	0,50	8	346,8	3,26	2,84
30	i	293,4	3,39	0,94	9	381,3	3,25	3,14
	j	415,6	3,36	1,31	10	510,0	3,18	3,00
36	k	211,6	3,44	0,56	11	440,3	3,28	2,07
	l	366,3	3,53	0,63	12	439,0	3,25	2,29
42	m	367,6	3,49	2,88	13	500,4	3,39	2,92
	n	197,7	3,50	0,66	14	436,2	3,30	2,83
48	o	309,9	3,33	3,40	15	147,9	3,36	2,51
	p	253,7	3,43	1,66	16	342,4	3,28	1,98
54	q	415,8	3,35	1,63	17	402,7	3,16	2,33
	r	253,0	3,42	1,27	18	348,5	3,12	1,76
60	s	263,6	3,37	1,69	19	451,9	3,23	3,36
	t	288,2	3,34	1,43	20	518,2	3,28	3,37
66	u	262,3	3,34	2,86	21	332,7	3,32	2,71
	v	333,5	3,12	1,38	22	375,5	3,32	2,61
72	x	255,4	3,34	3,45	23	460,9	3,33	2,85
	y	367,4	3,55	1,55	24	406,1	3,41	3,11

Po potvrzení kvality a koncentrace izolovaných RNA byly všechny vzorky přepsány do cDNA pomocí reverzní transkripce. Každá směs pro přepis byla připravena tak, aby obsahovala výslednou koncentraci RNA přibližně 100 ng/μl, což bylo optimální doporučené množství pro reakci. Tímto krokem byly také srovnány rozdíly v koncentracích vzniklé odběrem různých množství biomasy pro izolaci RNA. Výsledky reverzní transkripce vzorků RNA shrnuje tabulka 15.

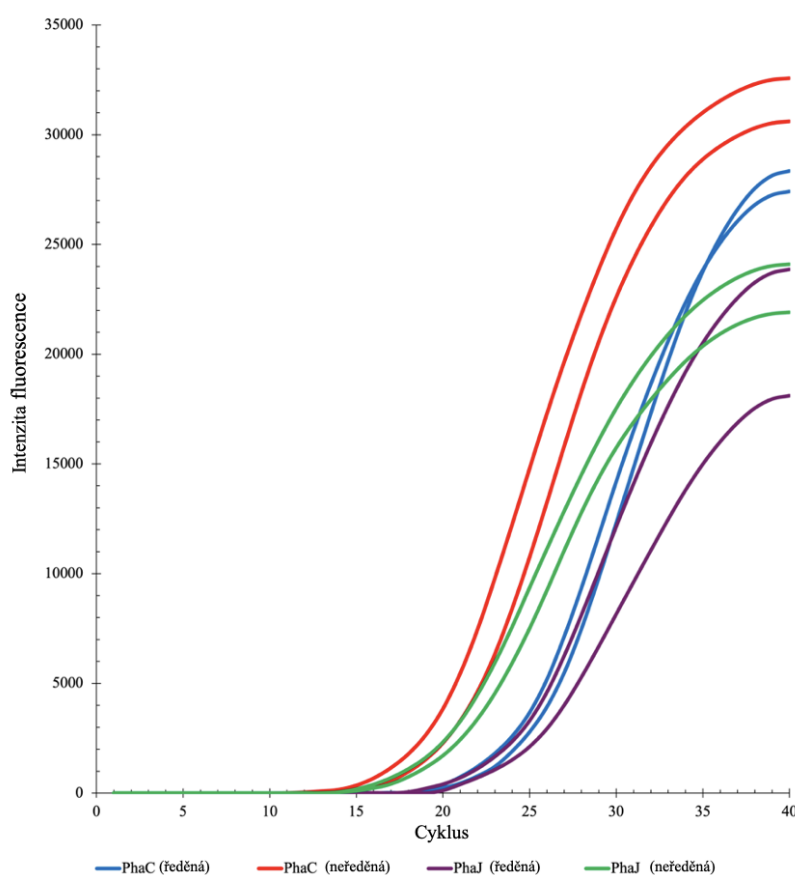
Tabulka 15: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty cDNA přepsané z vzorků RNA

Hodina	Komplexní médium				Minerální médium			
	Vzorek	c cDNA [ng/μl]	A260 /A280	A260 /A230	Vzorek	c cDNA [ng/μl]	A260 /A280	A260 /A230
6	a	2 927,6	1,78	2,14	1	2 239,6	1,85	2,21
	b	2 378,3	1,79	2,27	2	2 156,1	1,69	1,95
12	c	2 529,6	1,74	2,01	3	2 541,5	1,84	2,20
	d	2 346,3	1,79	2,24	4	2 324,3	1,84	2,29
18	e	2 594,2	1,53	1,63	5	2 636,3	1,78	1,80
	f	2 265,6	1,80	2,18	6	2 896,8	1,84	2,27
24	g	2 299,1	1,78	2,12	7	2 401,5	1,84	2,21
	h	2 388,1	1,73	1,66	8	2 455,4	1,77	1,84
30	i	2 751,5	1,71	1,71	9	2 463,3	1,78	1,79
	j	2 294,8	1,78	2,24	10	2 482,0	1,78	1,82
36	k	2 362,1	1,74	1,92	11	2 458,0	1,81	1,99
	l	2 306,1	1,72	1,85	12	2 441,5	1,83	2,25
42	m	2 430,9	1,77	2,18	13	2 349,8	1,83	2,27
	n	2 475,5	1,78	2,07	14	2 383,1	1,81	2,24
48	o	2 457,2	1,78	2,23	15	2 327,3	1,81	2,24
	p	2 478,4	1,66	1,80	16	2 333,9	1,80	2,16
54	q	2 439,8	1,72	2,04	17	2 455,3	1,78	2,17
	r	2 421,7	1,76	2,09	18	2 550,2	1,79	2,17
60	s	2 401,1	1,77	2,17	19	2 475,5	1,81	2,23
	t	2 479,4	1,78	2,11	20	2 517,8	1,80	2,14
66	u	2 362,1	1,77	2,25	21	2 605,2	1,80	2,22
	v	2 363,7	1,78	2,18	22	2 500,7	1,80	2,22
72	x	2 316,0	1,79	2,27	23	2 424,1	1,80	2,22
	y	2 384,9	1,78	2,14	24	2 430,5	1,81	2,23

Koncentrace cDNA byla spektrofotometricky stanovena v rozmezí 2 300-2 900 ng/μl. Oba poměry absorbancí určující čistotu se u většiny vzorků pohybovaly kolem hodnot vypovídajících o nepřítomnosti kontaminantů, což je u DNA 1,8 pro poměr A260/A280 a vyšší než 2 pro poměr A260/A230 [69].

4.3.4 Porovnání vhodné koncentrace cDNA pro qPCR

Před samotným měřením genové exprese bylo opět porovnáváno ideální množství DNA použité do směsi. První možností bylo využití výsledků stanovených v optimalizační části práce (100 ng/μl DNA). Druhá varianta vycházela z doporučení v kitu pro reverzní transkripci, jež uváděl použití 1 μl přešvané cDNA. Obě varianty byly testovány s použitím primerů PhaC a PhaJ. Současně byly použity DNA z různých hodin kultivace (6 h a 30 h). Získané výsledky amplifikačních křivek uvádí obrázek 19.



Obrázek 19: Výsledky měření qPCR s použitím různých koncentrací DNA

Jak vyplývá ze získaných dat, v obou případech byl získán vyšší signál u směsí připravovaných podle doporučení v kitu pro reverzní transkripci s koncentrací přibližně 2 500 ng/μl. Jelikož jednotlivé křivky reprezentují vzorky v různých hodinách, nebyla očekávána shodná intenzita signálu i přes použití stejné koncentrace DNA.

Lepší výsledky s použitím vyšší koncentrace DNA byly pravděpodobně způsobeny odlišnostmi v DNA. Po celou dobu optimalizace bylo pracováno s dvouřetězcovou gDNA, oproti tomu cDNA získaná reverzní transkripcí byla pouze jednořetězcová. Dalším výrazným rozdílem je také různá velikost molekul, kdy cDNA obsahuje maximálně 300 bp, což odpovídá nejdelšímu transkriptomu genu *phaC*. Naopak bakteriální genom obsahuje několik milionů párů bází. Jeho struktura je mnohem komplikovanější, například z pohledu tvorby sekundárních a vyšších struktur. Tyto jevy mohou znesnadňovat amplifikaci vybraných genů [72], proto je při analýze gDNA vhodné volit nižší koncentrace.

4.3.5 Měření genové exprese

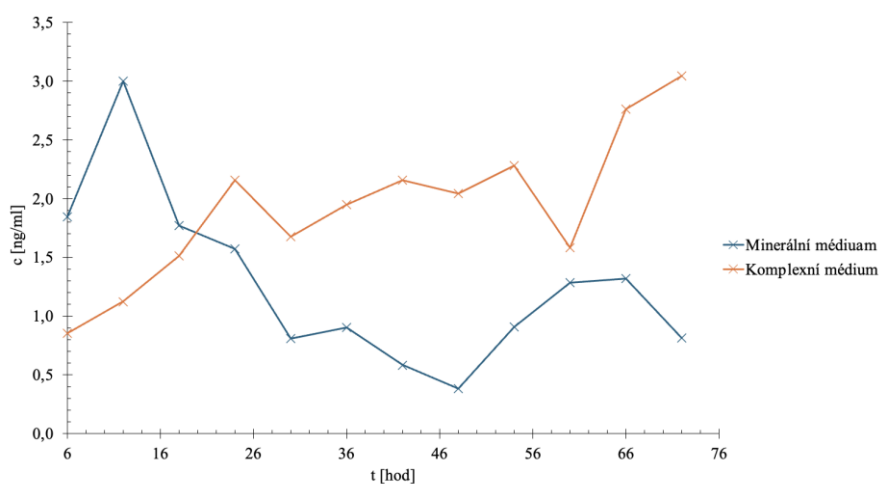
Porozumění genové expresi je jedním z klíčových faktorů pro objasnění biologických procesů, které je možné následně technologicky využívat. V této práci bylo pro studium vybráno několik genů souvisejících se syntézou PHA. Jelikož byla u zkoumaného organismu *Aneurinibacillus sp.* AFn2 předpokládána PHA syntáza IV. třídy, byla pozornost zaměřena na geny kódující její podjednotky, a to *phaC* a *phaR*. Dále byly vybrány geny *phaJ* a *fabG* kódující enzymy, které přeměňují různé meziprodukty β -oxidace na finální monomer podléhající polymeraci. Kromě již zmíněných genů byl vybrán také *phaP*, nesoucí informaci o phasinech čili proteinech zabezpečujících existenci PHA granulí v buňce. Pro vyhodnocování experimentu bylo nutné ověřit také stabilitu exprese vybraného housekeeping genu, jímž byl gen *recA*.

4.3.5.1 Ověření housekeeping genu

Expresí genů v organismech je většinou ovlivněna okolními podmínkami, čímž se zabraňuje neefektivní a energeticky náročné tvorbě proteinů, které v danou chvíli není potřeba tvořit. Některé proteiny mají pro fungování organismu ovšem zásadní vliv a nemohou být nahrazeny, proto je jejich syntéza a současně i exprese stabilní nezávisle na okolí. Takovým genům říkáme housekeeping geny a pro kvantitativní PCR mají z hlediska vyhodnocení výsledků velký význam. Právě jejich konstantní exprese se využívá při relativní kvantifikaci jiných sledovaných genů. Na principu využívání housekeeping genu je založena například Livakova metoda relativní kvantifikace [73].

V této práci byly testovány dva potenciální housekeeping geny. Prvním z nich byl *rpoD* kódující sigma podjednotku DNA polymerázy. Tento gen byl ovšem vyloučen na základě nespecifické amplifikace (diskutováno v kapitole o klasické PCR). Druhým studovaným genem byl *recA* nesoucí informace o proteinech podílejících se na reparačním mechanismu DNA.

Pro studium tohoto genu byla provedena RT-qPCR se vzorky odebíranými během měření růstové křivky. Získané výsledky zobrazuje obrázek 20. Z naměřených dat vyplývá, že *recA* nevykazuje konstantní expresi a není možné ho tedy používat jako housekeeping gen. Dokonce jeho se liší průběh exprese na jednotlivých médiích, což potvrzuje předpoklad ovlivňování tvorby tohoto proteinu okolním prostředím.



Obrázek 20: Průběh exprese genu *recA* v čase na komplexním a minerálním médiu

I přes to, že *rpoD* a *recA* jsou běžně využívané housekeeping geny, nebyl v této práci potvrzen ani jeden z nich. Mezi další často využívané housekeeping geny zejména u rodu *Bacillus* patří například geny kódující podjednotky DNA gyrázy (*gyrA* a *gyrB*) [74]. Možností jsou také geny pro ssb proteiny stabilizující jednovláknový konec DNA během replikace. Stabilita exprese se v jednotlivých druzích může lišit, proto by bylo vhodné otestovat některý z dalších housekeeping genů u studovaného *Aneurinibacillus sp.* AFn2.

4.3.5.2 Exprese vybraných genů

Jak vyplývá z předchozí kapitoly, gen *recA* nebylo možné použít jako referenční gen pro relativní kvantifikaci studovaných genů. Z toho důvodu byly sestaveny kalibrační křivky pro jednotlivé geny, podle kterých byla provedena absolutní kvantifikace. Při jejich sestavování byla vynesena závislost C_T hodnot na logaritmu známé koncentrace DNA. C_T hodnota (cycle of threshold) reflektuje cyklus, při kterém stoupne intenzita signálu nad práh pozadí. Současně platí, že vyšší C_T hodnoty odpovídají nižší koncentraci DNA. Tyto hodnoty byly získány automaticky během měření. Podle získaných regresních rovnic byla vypočítávána koncentrace každého genu v průběhu měření růstové křivky.

Při porovnání obou grafů (obrázek 21), je zřejmé, že průběh genové exprese na jednotlivých médiích se výrazně liší. V případě minerálního média byl na počátku kultivace pozorován rychlý nárůst koncentrace transkriptomů. Nejsilnější exprese byla u všech genů zaznamenána ve dvanácté hodině kultivace. Následně nastal pokles, a to až do 42 hodiny, od které se trend jednotlivých transkriptomů mírně odlišuje, avšak stále zůstává poměrně nízký v porovnání s maximální expresí.

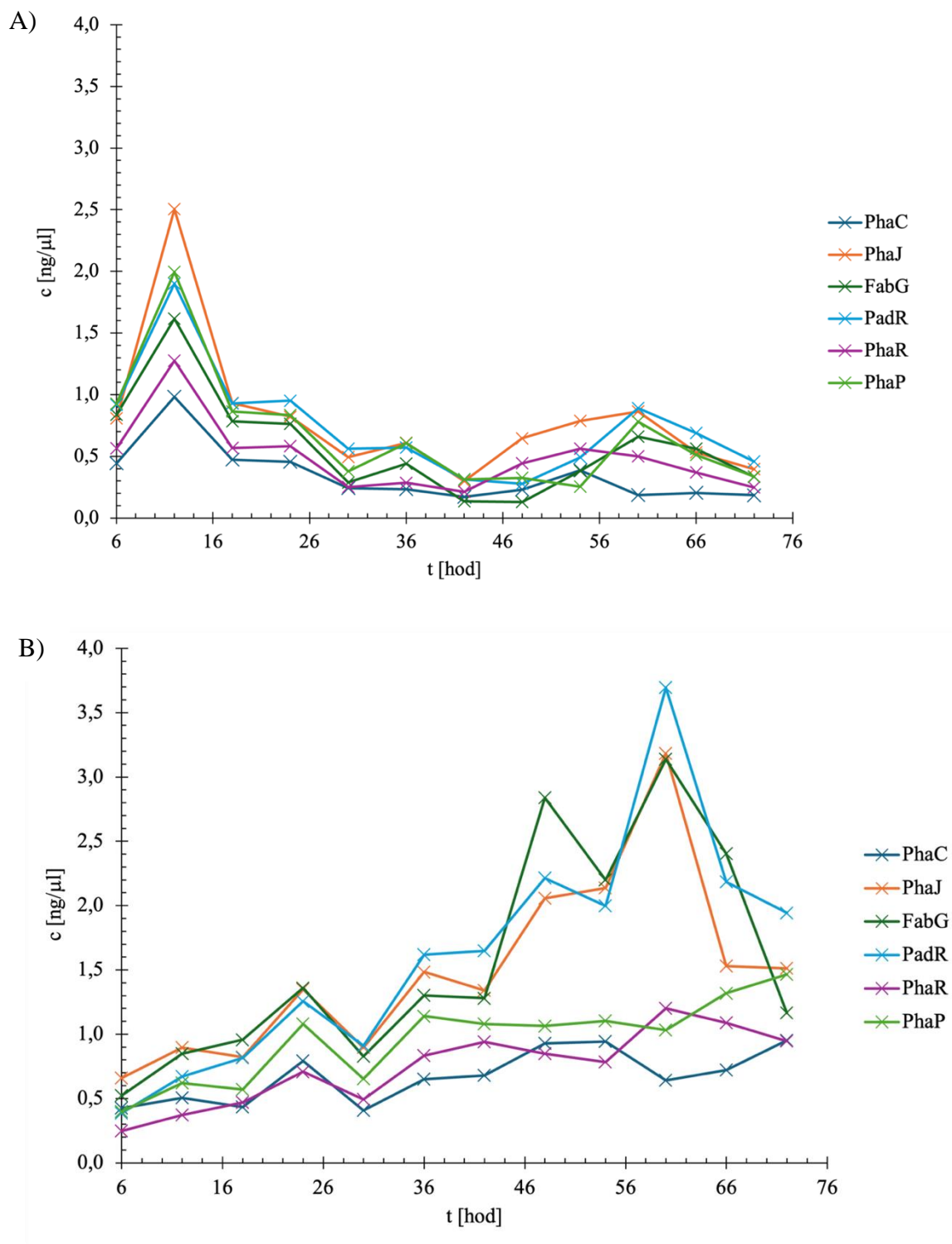
Naopak trend exprese na komplexním médiu se výrazně liší (obrázek 21 B). V průběhu měření zde byla u všech genů zaznamenána stoupající koncentrace v čase. Do třicáté šesté hodiny se od sebe průběh jednotlivých křivek příliš neliší. Rozdíl byl zaznamenán v druhé polovině růstové fáze, kdy došlo k oddělení dvou trendů. Exprese genů *phaC*, *phaR* a *phaP* zůstala od 36 h přibližně konstantní. Naopak u genů *phaJ*, *fabG* a *padR* byl pozorován překvapivý prudký nárůst.

V obou případech byla pozorována nejnižší exprese genů *phaC* a *phaR* kódující podjednotky PHA syntázy. Na minerálním médiu byla ovšem po celou dobu pozorována mírně vyšší exprese genu *phaR* než *phaC*. V komplexním médiu se však tento trend neopakoval. Docházelo zde k proměňování intenzity exprese těchto dvou genů.

V souvislosti s produkcí PHA na minerálním médiu lze předpokládat, že nižší zaplněnost buněk PHA granulemi souvisela právě také s průběhem exprese jednotlivých genů. Na počátku kultivace byly vytvořeny proteiny vystupující v anabolismu PHA, které následně katalyzovaly jejich syntézu. Oproti tomu na komplexním médiu koreluje produkce P(3HB) s trendem genové exprese. Výrazný nárůst mezi 42 h a 54 h mohl souviset s vysokou expresí genů *phaJ* a *fabG*.

Pro lepší pochopení a interpretaci získaných výsledků by bylo vhodné měřit také další parametry související s produkcí PHA. Například genovou expresí dalších genů zapojených do syntézy jako *phaA*, *phaB* nebo *fabD*. Exprese jednotlivých genů také nevypovídá o jejich funkčnosti v buňce, proto by bylo z tohoto hlediska možné zapojit měření enzymatické aktivity daných enzymů. Zajímavý pohled by mohlo přinést také studium PhaZ depolymerázy, její exprese a aktivity. Samotná produkce není však ovlivněna pouze přítomnými enzymy.

Významnou roli hraje také vliv substrátu a prostředí. S hlubším pochopením by mohlo tedy pomoci například i měření změn koncentrace substrátu v jednotlivých médiích nebo koncentrace kyslíku.



Obrázek 21: Graf A) zobrazující průběh genové exprese na minerálním médiu, graf B) průběh genové exprese stejných genů na komplexním médiu

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo studium exprese vybraných genů souvisejících s biosyntézou PHA u termofilní bakterie *Aneurinibacillus sp.* AFn2. Tento producent je významný v souvislosti se schopností tvorby netradičních kopolymerů PHA. Na tomto základě byl zvolen jako studovaný organismus.

V první části práce byly testovány a optimalizovány jednotlivé postupy pro analýzu genů. Jedním z nich byla PCR, pomocí které byla určena specifita používaných primerů a jejich annealingová teplota. Na základě výsledků byl z důvodu nespecifity primeru vyřazen gen *rpoD*, který mohl potenciálně sloužit jako referenční gen při měření genové exprese. Kromě vyřazení genu *rpoD* byla podle získaných dat upravena annealingová teplota primerů *PhaC* a *RecA*, a to z 65 °C na 55 °C.

Další částí optimalizace bylo vybrání nejvhodnějšího způsobu izolace RNA. Za tímto účelem byly využity komerčně dostupné kity. Z šesti testovaných způsobů byl na základě vysoké koncentrace, reprodukovatelnosti a čistoty vzorků vybrán kit Geneproof. Průměrné výsledky izolace RNA pomocí tohoto kitu dosahovaly hodnot koncentrace 330 ng/μl.

Po testování funkčnosti primerů a izolaci RNA bylo pro měření genové exprese stěžejním krokem určit vhodné složení směsi pro kvantitativní PCR. Měření bylo prováděno pomocí dvou master mixů, ve kterých byla upravována koncentrace DNA, primerů a hořčičných iontů, což jsou jedny z klíčových faktorů ovlivňující efektivitu reakce. Jako nejvhodnější byla určena směs připravená z master mixu SYTO s DNA o výsledné koncentraci 100 ng/μl a primery s koncentrací 0,4 uM. Toto složení bylo později porovnáváno i s doporučeným množstvím DNA podle kitu pro reverzní transkripci (přibližně 2500 ng/μl), které pro c DNA dosahovalo lepších výsledků. Bylo tedy zvoleno i pro část měření genové exprese.

V druhé části práce byla měřena růstová křivka na dvou typech médií, jež reprezentovaly podmínky s limitací živin (minerální médium) a s komplexním zdrojem živin (bez limitace). V obou médiích vystupovala jako substrát glukóza ovšem v rozdílných koncentracích. I přes nižší nárůst biomasy na komplexním médiu v něm byla zaznamenána vyšší procentuální produkce P(3HB) a to až 70 % hmotnosti suché biomasy. Oproti tomu na minerálním médiu byl pozorován vyšší nárůst buněk s jejich zaplněním P(3HB) granulemi maximálně ze 40 %.

Pro vzorky z růstových křivek byla současně měřena i genová exprese pomocí RT-qPCR. Kromě genů spojených se syntézou PHA byl studován také gen *recA* s potenciálním využitím jako housekeeping gen. Konstantní exprese ovšem nebyla potvrzena ani v jednom médiu. Pro vyhodnocení zbylých genů byla použita kalibrační křivka, ze které byla podle C_T hodnot stanovena koncentrace transkriptomů v průběhu kultivace. Průběh exprese genů na jednotlivých médiích se výrazně lišil. Na minerálním médiu byl z počátku pozorován prudký nárůst koncentrace všech transkriptomů. Po zbytek kultivace se však jejich obsah snižoval, což pravděpodobně vedlo k nižšímu zaplnění buněk PHA. Naopak na komplexním médiu byl rostoucí trend exprese genů pozorován po celou dobu kultivace. Také procentuální zastoupení PHA v buňkách bylo vyšší.

Závěrem lze tedy říci, že tato bakalářská práce přinesla poznatky nejen z pohledu optimalizace metod, a to zejména izolace RNA a RT-qPCR, ale také ze samotného měření exprese vybraných genů v závislosti na typu kultivačního média. Získané výsledky by mohly přispět k přesnějšímu pochopení syntézy PHA ve spojitosti se zapojováním různých genů.

6 Reference

- [1] OBRUČA, Stanislav; DVOŘÁK, Pavel; SEDLÁČEK, Petr; KOLLER, Martin; SEDLÁŘ, Karel et al. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. Online. *Biotechnology Advances*. 2022, roč. 58. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>. [cit. 2023-03-31].
- [2] OBRUCA, Stanislav; SEDLACEK, Petr; KOLLER, Martin; KUCERA, Dan a PERNICOVA, Iva. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. Online. *Biotechnology Advances*. 2018. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>. [cit. 2023-03-31].
- [3] KOLLER, Martin; MARŠÁLEK, Lukáš; DE SOUSA DIAS, Miguel Miranda a BRAUNEGG, Gerhart. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. Online. *New Biotechnology*. 2017, roč. 37, s. 24-38. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>. [cit. 2024-05-13].
- [4] MOZEJKO-CIESIELSKA, Justyna; SZACHERSKA, Karolina a MARCINIAK, Paulina. Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2019, roč. 27, č. 6, s. 1151-1166. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>. [cit. 2024-05-13].
- [5] KUNASUNDARI, B. a SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. Online. *Express Polymer Letters*. 2011, roč. 5, č. 7, s. 620-634. ISSN 1788618X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>. [cit. 2024-05-13].
- [6] BRESAN, Stephanie; SZNAJDER, Anna; HAUF, Waldemar; FORCHHAMMER, Karl; PFEIFFER, Daniel et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. Online. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep26612>. [cit. 2024-05-13].
- [7] FU, Xiao-Zhi; TAN, Dan; AIBAIDULA, Gulsimay; WU, Qiong; CHEN, Jin-Chun et al. Development of Halomonas TD01 as a host for open production of chemicals. Online. *Metabolic Engineering*. 2014, roč. 23, s. 78-91. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.006>. [cit. 2024-05-13].
- [8] PARK, Si Jae; KIM, Tae Wan; KIM, Min Kyung; LEE, Sang Yup a LIM, Sung-Chul. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. Online. *Biotechnology Advances*. 2012, roč. 30, č. 6, s. 1196-1206. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.007>. [cit. 2024-05-13].
- [9] MUHAMMADI; SHABINA; AFZAL, Muhammad a HAMEED, Shafqat. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. Online. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2015, roč. 8, č. 3-4, s. 56-77. ISSN 1751-8253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>. [cit. 2024-05-13].
- [10] OJUMU, T. V.; YU, J. a SOLOMON, B. O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. Online. *African Journal of Biotechnology*. 2004, roč. 3, č. 1, s. 18-24. ISSN 1684-5315. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2004>. [cit. 2024-05-13].

- [11] RAZA, Zulfiqar Ali; ABID, Sharjeel a BANAT, Ibrahim M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. Online. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, roč. 126, s. 45-56. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>. [cit. 2024-05-13].
- [12] TANG, Hui Jia; NEOH, Soon Zher a SUDESH, Kumar. A review on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] and genetic modifications that affect its production. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1057067>. [cit. 2024-05-13].
- [13] BEHERA, Shivananda; PRIYADARSHANEE, Monika; VANDANA a DAS, Surajit. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. Online. *Chemosphere*. 2022, roč. 294. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133723>. [cit. 2024-05-13].
- [14] SARAVANAN, Koushika; UMESH, Mridul a KATHIRVEL, Preethi. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): A Review on Biosynthesis, Properties, Fermentation Strategies and Its Prospective Applications for Sustainable Future. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2022, roč. 30, č. 12, s. 4903-4935. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02562-7>. [cit. 2024-05-13].
- [15] ZHENG, Yang; CHEN, Jin-Chun; MA, Yi-Ming a CHEN, Guo-Qiang. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. Online. *Metabolic Engineering*. 2020, roč. 58, s. 82-93. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.004>. [cit. 2024-05-13].
- [16] TEBALDI, Marli Luiza; MAIA, Ana Luiza Chaves; POLETTO, Fernanda; DE ANDRADE, Fabricio Vieira a SOARES, Daniel Cristian Ferreira. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019, roč. 51, s. 115-126. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.007>. [cit. 2024-05-13].
- [17] CHE, Lin; JIN, Wenbiao; ZHOU, Xu; HAN, Wei; CHEN, Yidi et al. Current status and future perspectives on the biological production of polyhydroxyalkanoates. Online. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2023, roč. 18, č. 3. ISSN 1932-2135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/apj.2899>. [cit. 2024-05-13].
- [18] KUTRALAM-MUNIASAMY, Gurusamy; CORONA-HERNANDEZ, Juan; NARAYANASAMY, Ravi-Kumar; MARSCH, Rodolfo a PÉREZ-GUEVARA, Fermín. Phylogenetic diversification and developmental implications of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate gene cluster assembly in prokaryotes. Online. *FEMS Microbiology Letters*. 2017, roč. 364, č. 13. ISSN 1574-6968. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx135>. [cit. 2024-05-13].
- [19] VICENTE, Diogo; PROENÇA, Diogo Neves a MORAIS, Paula V. The Role of Bacterial Polyhydroxyalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. Online. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023, roč. 20, č. 4. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>. [cit. 2024-05-13].

- [20] ZHER NEOH, Soon; FEY CHEK, Min; TIANG TAN, Hua; LINARES-PASTÉN, Javier A.; NANDAKUMAR, Ardra et al. Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. Online. *Current Research in Biotechnology*. 2022, roč. 4, s. 87-101. ISSN 25902628. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.002>. [cit. 2024-05-13].
- [21] MEZZOLLA, Valeria; D'URSO, Oscar a POLTRONIERI, Palmiro. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. Online. *Polymers*. 2018, roč. 10, č. 8. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym10080910>. [cit. 2024-05-13].
- [22] ZOU, Huibin; SHI, Mengxun; ZHANG, Tongtong; LI, Lei; LI, Liangzhi et al. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, roč. 101, č. 20, s. 7417-7426. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8485-0>. [cit. 2024-05-13].
- [23] WITTENBORN, Elizabeth C.; JOST, Marco; WEI, Yifeng; STUBBE, JoAnne a DRENNAN, Catherine L. Structure of the Catalytic Domain of the Class I Polyhydroxybutyrate Synthase from *Cupriavidus necator*. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, roč. 291, č. 48, s. 25264-25277. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756833>. [cit. 2024-05-13].
- [24] MEEREBOER, Kjeld W.; MISRA, Manjusri a MOHANTY, Amar K. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. Online. *Green Chemistry*. 2020, roč. 22, č. 17, s. 5519-5558. ISSN 1463-9262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0GC01647K>. [cit. 2024-05-13].
- [25] ZHOU, Wen; BERGSMA, Simon; COLPA, Dana Irene; EUVERINK, Gert-Jan Willem a KROONEMAN, Janneke. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. Online. *Journal of Environmental Management*. 2023, roč. 341. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>. [cit. 2024-05-13].
- [26] ZHOU, Wen; BERGSMA, Simon; COLPA, Dana Irene; EUVERINK, Gert-Jan Willem a KROONEMAN, Janneke. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. Online. *Journal of Environmental Management*. 2023, roč. 341. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>. [cit. 2024-05-13].
- [27] OKOLIE, Obinna; KUMAR, Anuj; EDWARDS, Christine; LAWTON, Linda A.; OKE, Adekunle et al. Bio-Based Sustainable Polymers and Materials: From Processing to Biodegradation. Online. *Journal of Composites Science*. 2023, roč. 7, č. 6. ISSN 2504-477X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcs7060213>. [cit. 2024-05-13].
- [28] SCHRÖDER, Carola; BURKHARDT, Christin a ANTRANIKIAN, Garabed. What we learn from extremophiles. Online. *ChemTexts*. 2020, roč. 6, č. 1. ISSN 2199-3793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40828-020-0103-6>. [cit. 2024-05-13].
- [29] SALWAN, Richa a SHARMA, Vivek. Genomics of prokaryotic extremophiles to unfold the mystery of survival in extreme environments. Online. *Microbiological Research*. 2022, roč. 264. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127156>. [cit. 2024-05-13].

- [30] GUPTA, G.N.; SRIVASTAVA, S.; KHARE, S.K. a PRAKASH, V. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. Online. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 2014, roč. 7, č. 2. ISSN 0974-1712. Dostupné z: <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>. [cit. 2024-05-13].
- [31] PIKUTA, Elena V.; HOOVER, Richard B. a TANG, Jane. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. Online. Critical Reviews in Microbiology. 2008, roč. 33, č. 3, s. 183-209. ISSN 1040-841X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408410701451948>. [cit. 2024-05-13].
- [32] STETTER, Karl O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. Online. FEBS Letters. 1999, roč. 452, č. 1-2, s. 22-25. ISSN 0014-5793. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00663-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00663-8). [cit. 2024-05-13].
- [33] HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H. a FRISVAD, J. C. Rasamsonia, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic Talaromyces and Geosmithia species. Online. Antonie van Leeuwenhoek. 2012, roč. 101, č. 2, s. 403-421. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9647-1>. [cit. 2024-05-13].
- [34] ZELDES, Benjamin M.; KELLER, Matthew W.; LODER, Andrew J.; STRAUB, Christopher T.; ADAMS, Michael W. W. et al. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. Online. Frontiers in Microbiology. 2015, roč. 6. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01209>. [cit. 2024-05-13].
- [35] SOMAYAJI, Adithi; DHANJAL, Chetan Roger; LINGAMSETTY, Rathnamegha; VINAYAGAM, Ramesh; SELVARAJ, Raja et al. An insight into the mechanisms of homeostasis in extremophiles. Online. Microbiological Research. 2022, roč. 263. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127115>. [cit. 2024-05-13].
- [36] PATI, Swatilekha; BANERJEE, Somok; SENGUPTA, Aveepsa; SARMA, Jayshree; SHAHEEN, Shakila et al. Adaptation strategies of thermophilic microbes. Online. In: Bacterial Survival in the Hostile Environment. Elsevier, 2023, s. 231-249. ISBN 9780323918060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91806-0.00012-6>. [cit. 2024-05-13].
- [37] MEHTA, Deepika a SATYANARAYANA, Tulasi. Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. Online. In: SATYANARAYANA, Tulasi; LITTLECHILD, Jennifer a KAWARABAYASI, Yutaka (ed.). Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, s. 3-60. ISBN 978-94-007-5898-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_1. [cit. 2024-05-13].
- [38] SCHULTZ, Júnia; DOS SANTOS, Alef; PATEL, Niketan a ROSADO, Alexandre Soares. Life on the Edge: Bioprospecting Extremophiles for Astrobiology. Online. Journal of the Indian Institute of Science. 2023, roč. 103, č. 3, s. 721-737. ISSN 0970-4140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s41745-023-00382-9>. [cit. 2024-05-13].
- [39] BARANOVA, A. A.; ALFEROVA, V. A.; KORSHUN, V. A. a TYURIN, A. P. Antibiotics from Extremophilic Micromycetes. Online. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2020, roč. 46, č. 6, s. 903-971. ISSN 1068-1620. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S1068162020060023>. [cit. 2024-05-13].

- [40] YU, Lin-Ping; WU, Fu-Qing a CHEN, Guo-Qiang. Next-Generation Industrial Biotechnology-Transforming the Current Industrial Biotechnology into Competitive Processes. Online. *Biotechnology Journal*. 2019, roč. 14, č. 9. ISSN 1860-6768. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/biot.201800437>. [cit. 2024-05-13].
- [41] CHEN, Guo-Qiang a JIANG, Xiao-Ran. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, roč. 50, s. 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>. [cit. 2024-05-13].
- [42] TAN, Dan; WANG, Ying; TONG, Yi a CHEN, Guo-Qiang. Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs). Online. *Trends in Biotechnology*. 2021, roč. 39, č. 9, s. 953-963. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.010>. [cit. 2024-05-13].
- [43] COKER, James. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. Online. 2016. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.7432.1>. [cit. 2024-05-13].
- [44] KOURILOVA, Xenie; PERNICOVA, Iva; SEDLAR, Karel; MUSILOVA, Jana; SEDLACEK, Petr et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. Online. *Bioresource Technology*. 2020, roč. 315. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123885>. [cit. 2024-05-13].
- [45] KACANSKI, Milos; STELZER, Franz; WALSH, Meg; KENNY, Shane; O'CONNOR, Kevin et al. Pilot-scale production of mcl-PHA by *Pseudomonas citronellolis* using acetic acid as the sole carbon source. Online. *New Biotechnology*. 2023, roč. 78, s. 68-75. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.10.003>. [cit. 2024-05-13].
- [46] PADUVARI, Raghavendra; SUBRAHMANYA BHAT, K. a SOMASHEKARA, Divyashree Mysore. Biosynthesis of 3-hydroxydecanoate (3HD) and 3-hydroxydodecanoate (3HDd) in the polyhydroxyalkanoate copolymeric ester chain by *Pseudomonas aeruginosa* MCC 5300 using oleic acid as a carbon source. Online. *Bioresource Technology Reports*. 2024, roč. 25. ISSN 2589014X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101690>. [cit. 2024-05-13].
- [47] PERNICOVA, Iva; NOVACKOVA, Ivana; SEDLACEK, Petr; KOURILOVA, Xenie; KALINA, Michal et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. Online. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 6. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym12061235>. [cit. 2024-05-13].
- [48] WHITMAN, William B. (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Online. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118960608>. [cit. 2024-05-13].
- [49] REHAKOVA, Veronika; PERNICOVA, Iva; KOURILOVA, Xenie; SEDLACEK, Petr; MUSILOVA, Jana et al. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus *Aneurinibacillus*. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 225, s. 1588-1598. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215>. [cit. 2024-05-13].
- [50] SNUSTAD, Peter a SIMONS, Michel J. *Genetika*. 2. vydání. Brno: Munipress, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

- [51] THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Online. *Journal of Biotechnology*. 1999, roč. 75, č. 2-3, s. 291-295. ISSN 01681656. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00163-7). [cit. 2024-05-13].
- [52] KIM, Sung H. TIRF-Based Single-Molecule Detection of the RecA Presynaptic Filament Dynamics. Online. In: *Mechanisms of DNA Recombination and Genome Rearrangements: Methods to Study Homologous Recombination*. *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2018, s. 233-253. ISBN 9780128144299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.11.012>. [cit. 2024-05-13].
- [53] TAKLE, Gunnhild W; TOTH, Ian K a BRURBERG, May B. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. Online. *BMC Plant Biology*. 2007, roč. 7, č. 1. ISSN 1471-2229. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-50>. [cit. 2024-05-13].
- [54] SCHUWIRTH, Barbara S.; BOROVINSKAYA, Maria A.; HAU, Cathy W.; ZHANG, Wen; VILA-SANJURJO, Antón et al. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. Online. *Science*. 2005, roč. 310, č. 5749, s. 827-834. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1117230>. [cit. 2024-05-13].
- [55] YANG, Bo; WANG, Yong a QIAN, Pei-Yuan. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. Online. *BMC Bioinformatics*. 2016, roč. 17, č. 1. ISSN 1471-2105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>. [cit. 2024-05-13].
- [56] LÓPEZ-ALADID, Ruben; FERNÁNDEZ-BARAT, Laia; ALCARAZ-SERRANO, Victoria; BUENO-FREIRE, Leticia; VÁZQUEZ, Nil et al. Determining the most accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. Online. *Scientific Reports*. 2023, roč. 13, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30764-z>. [cit. 2024-05-13].
- [57] PAGET, Mark SB a HELMANN, John D. Online. *Genome Biology*. Roč. 4, č. 1. ISSN 14656906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-1-203>. [cit. 2024-05-13].
- [58] CUSICK, Kathleen D.; FITZGERALD, Lisa A.; COCKRELL, Allison L.; BIFFINGER, Justin C. a DETTMAN, Robert W. Selection and Evaluation of Reference Genes for Reverse Transcription-Quantitative PCR Expression Studies in a Thermophilic Bacterium Grown under Different Culture Conditions. Online. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131015>. [cit. 2024-05-13].
- [59] REITER, Lillian; KOLSTØ, Anne-Brit a PIEHLER, Armin P. Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. Online. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, roč. 86, č. 2, s. 210-217. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.006>. [cit. 2024-05-13].
- [60] CODNER, Gemma F.; ERBS, Valerie; LOEFFLER, Jorik; CHESSUM, Lauren; CAULDER, Adam et al. Universal Southern blot protocol with cold or radioactive probes for the validation of alleles obtained by homologous recombination. Online. *Methods*. 2021, roč. 191, s. 59-67. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.011>. [cit. 2024-05-13].

- [61] VANGUILDER, Heather D.; VRANA, Kent E. a FREEMAN, Willard M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Online. *BioTechniques*. 2008, roč. 44, č. 5, s. 619-626. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://doi.org/10.2144/000112776>. [cit. 2024-05-13].
- [62] PERNICOVÁ, Iva. Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/133858>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.
- [63] “What is TRIzol®? Online. ZYMO RESEARCH. 2024. Dostupné z: <https://zymoresearch.eu/pages/what-is-trizol>. [cit. 2024-04-11].”
- [64] XIAO, Zijun; ZHANG, Yu; XI, Lijun; HUO, Fangfang; ZHAO, Jing-yi et al. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. Online. *Journal of Basic Microbiology*. 2015, ISSN 0233111X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jobm.201400843>. [cit. 2024-05-13].
- [65] GAO, Yang a YANG, Wei. Capture of a third Mg²⁺ is essential for catalyzing DNA synthesis. Online. *Science*. 2016, roč. 352, č. 6291, s. 1334-1337. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aad9633>. [cit. 2024-05-13].
- [66] *SYTO-9 qPCR 2x Master Mix*. Online. 2024. Dostupné z: <https://www.top-bio.cz/syto-9-qpcr-2x-master-mix>. [cit. 2024-04-19].
- [67] SIDSTEDT, Maja; RÅDSTRÖM, Peter a HEDMAN, Johannes. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, roč. 412, č. 9, s. 2009-2023. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>. [cit. 2024-05-13].
- [68] A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. Online. 2010. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_070283.pdf. [cit. 2024-05-16].
- [69] T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers , 260/280 and 260/230 Ratios. Online. Dostupné z: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf. [cit. 2024-04-19].
- [70] KOETSIER, Giron a CANTOR, Eric. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Online. Biolabs, 2019. Dostupné z: https://www.bioke.com/blobs/downloads/NEB/MVS_Analysis_of_NA_Concentration_and_Purity.pdf. [cit. 2024-05-16].

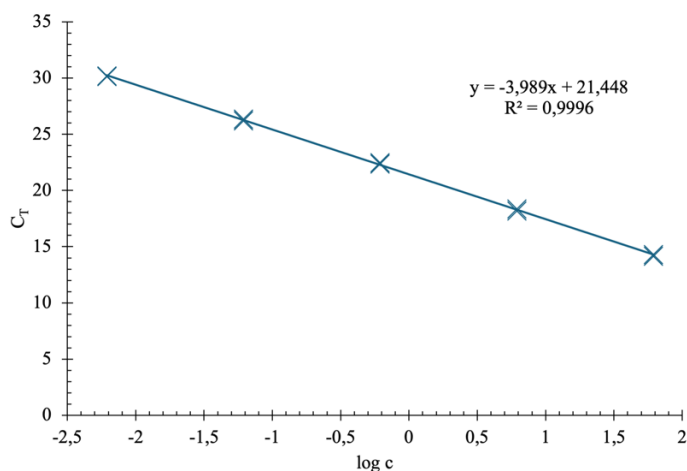
- [71] BASAK, Bertan; INCE, Orhan; ARTAN, Nazik; YAGCI, Nevin a INCE, Bahar Kasapgil. Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. Online. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011, roč. 34, č. 8, s. 1007-1016. ISSN 1615-7591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0551-x>. [cit. 2024-05-13].
- [72] FAN, Huijun; WANG, Jing; KOMIYAMA, Makoto a LIANG, Xingguo. Effects of secondary structures of DNA templates on the quantification of qPCR. Online. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019, roč. 37, č. 11, s. 2867-2874. ISSN 0739-1102. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1498804>. [cit. 2024-05-13].
- [73] Real-Time PCR Application guide. Online. In: . Biolabs, 2006. Dostupné z: https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. [cit. 2024-05-16].
- [74] LIU, Yan; ŠTEFANIČ, Polonca; MIAO, Youzhi; XUE, Yansheng; XUN, Weibing et al. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. Online. *AMB Express*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2191-0855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01477-9>. [cit. 2024-05-13].

7 Seznam používaných zkratek

4HV	4-hydroxyvalerát
bp	páry bází (base pairs)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
C _T	prahový cyklus (cycle of trashold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
HRM	analýza křivek tání (high resolution melting)
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
MM	minerální médium
NB	nutrient broth
OD	optická hustota
P(3HB)	poly-3-hydroxybutyrát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
TBE pufr	tris-borát-EDTA pufr

8 Přílohy

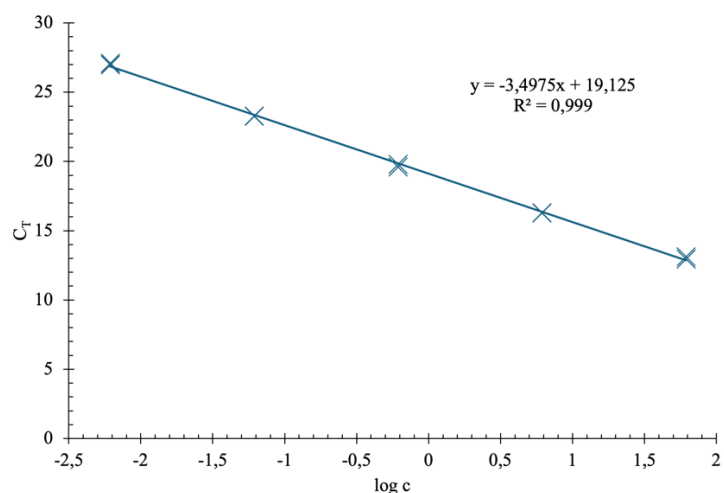
Níže jsou na obrázcích 22 až 28 uvedeny kalibrační křivky pro jednotlivé geny studované během měření genové exprese. Dále tabulky s naměřenými C_T hodnotami pro studované vzorky. Vzorky označené číslicemi 1-24 označují odběry z minerálního média a písmeny a-y vzorky z komplexního média.



Obrázek 22: Kalibrační křivka pro gen *recA*

Tabulka 16: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *recA*

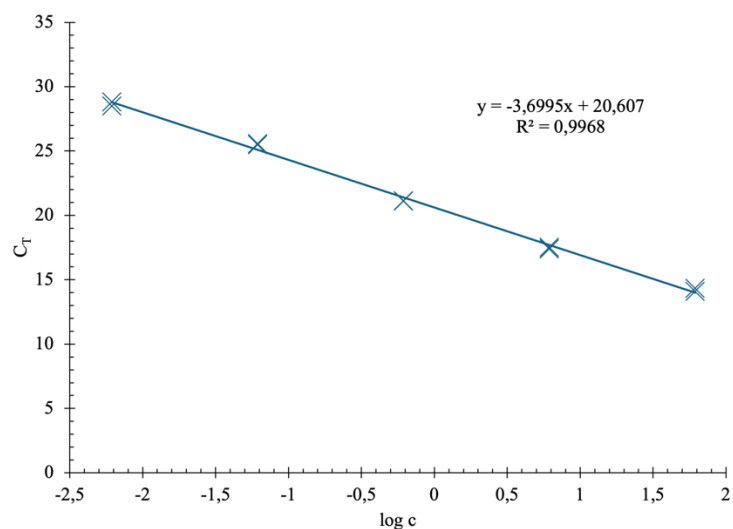
Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	20,48	a	22,16	42	13	23,38	m	20,26
	1	20,59	a	21,41		13	22,91	m	19,82
	2	20,29	b	21,64		14	21,93	n	20,24
	2	20,21	b	21,77		14	21,79	n	20,18
12	3	19,46	c	21,36	48	15	24,14	o	19,43
	3	19,38	c	21,09		15	24,49	o	19,26
	4	19,81	d	21,26		16	22,22	p	21,73
	4	19,56	d	21,28		16	22,62	p	22,35
18	5	20,61	e	21,80	54	17	22,05	q	20,63
	5	20,66	e	21,88		17	21,86	q	20,66
	6	20,29	f	19,73		18	21,21	r	19,65
	6	20,31	f	20,46		18	21,45	r	19,47
24	7	20,88	g	20,28	60	19	20,60	s	20,25
	7	20,82	g	20,24		19	20,59	s	19,96
	8	20,38	h	19,95		20	21,60	t	20,66
	8	20,61	h	20,02		20	21,52	t	23,07
30	9	21,59	i	20,51	66	21	21,70	u	20,05
	9	21,78	i	20,81		21	21,26	u	20,07
	10	22,00	j	20,49		22	20,62	v	19,43
	10	21,88	j	20,43		22	20,54	v	19,33
36	11	21,68	k	19,96	72	23	21,63	x	19,41
	11	21,65	k	19,92		23	21,90	x	19,40
	12	21,21	l	20,59		24	21,74	y	19,59
	12	22,05	l	20,89		24	21,95	y	19,69



Obrázek 23: Kalibrační křivka pro gen *phaC*

Tabulka 17: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *phaC*

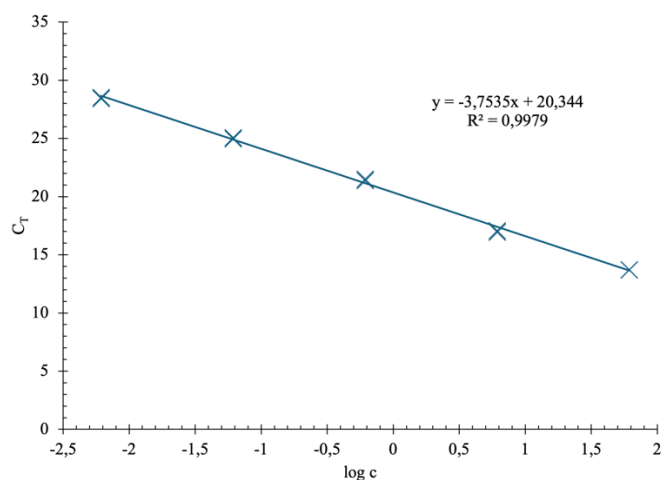
Hodina	Vzorek	C _T	Vzorek	C _T	Hodina	Vzorek	C _T	Vzorek	C _T
6	1	20,48	a	20,12	42	13	22,61	m	19,81
	1	20,50	a	20,15		13	22,77	m	19,36
	2	20,10	b	20,69		14	21,18	n	19,93
	2	20,40	b	20,89		14	21,36	n	19,81
12	3	18,99	c	20,29	48	15	23,18	o	18,90
	3	19,06	c	20,15		15	20,40	o	18,54
	4	19,15	d	20,27		16	23,23	p	20,30
	4	19,45	d	19,96		16	20,71	p	19,84
18	5	20,65	e	21,49	54	17	20,69	q	20,88
	5	20,52	e	21,27		17	21,70	q	18,99
	6	19,99	f	19,83		18	19,38	r	19,19
	6	20,01	f	19,76		18	21,90	r	18,60
24	7	20,24	g	19,36	60	19	20,63	s	19,31
	7	20,51	g	19,84		19	22,82	s	19,32
	8	20,26	h	19,32		20	21,74	t	20,50
	8	20,29	h	19,45		20	22,58	t	20,54
30	9	21,92	i	20,88	66	21	22,59	u	19,87
	9	21,59	i	20,46		21	21,71	u	19,47
	10	21,41	j	20,46		22	21,46	v	19,64
	10	20,55	j	20,22		22	20,91	v	19,54
36	11	21,51	k	19,34	72	23	21,94	x	18,87
	11	21,28	k	19,42		23	22,28	x	19,32
	12	21,07	l	20,21		24	21,24	y	19,28
	12	21,58	l	20,43		24	21,53	y	19,39



Obrázek 24: Kalibrační křivka pro gen *phaJ*

Tabulka 18: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *phaJ*

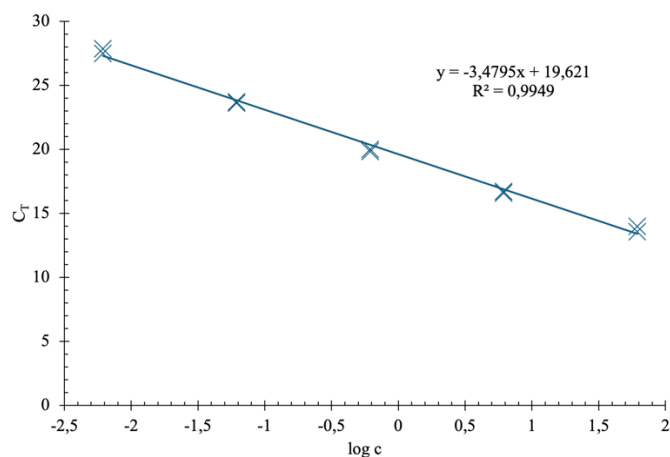
Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	21,47	a	21,90	42	13	23,30	m	20,19
	1	21,17	a	21,37		13	22,65	m	20,09
	2	20,81	b	20,70		14	21,92	n	20,11
	2	20,52	b	21,36		14	22,64	n	20,16
12	3	19,10	c	20,35	48	15	22,34	o	19,22
	3	19,05	c	20,93		15	20,37	o	19,02
	4	19,11	d	20,71		16	20,68	p	19,02
	4	19,28	d	21,29		16	23,90	p	21,76
18	5	21,27	e	22,54	54	17	20,39	q	19,31
	5	20,92	e	22,33		17	21,89	q	20,00
	6	20,40	f	20,35		18	20,86	r	18,98
	6	20,44	f	19,99		18	21,19	r	19,42
24	7	20,96	g	20,29	60	19	20,73	s	19,04
	7	20,70	g	20,34		19	20,33	s	19,33
	8	20,59	h	19,78		20	21,22	t	17,87
	8	21,64	h	20,15		20	21,28	t	19,22
30	9	22,41	i	21,32	66	21	21,98	u	20,09
	9	21,58	i	20,80		21	21,78	u	19,60
	10	22,10	j	20,70		22	21,41	v	19,93
	10	21,16	j	20,44		22	21,38	v	20,13
36	11	21,61	k	19,60	72	23	22,23	x	20,10
	11	21,62	k	19,48		23	22,17	x	20,04
	12	21,11	l	20,52		24	22,25	y	19,79
	12	21,33	l	20,62		24	21,80	y	19,86



Obrázek 25: Kalibrační křivka pro gen *fabG*

Tabulka 19: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *fabG*

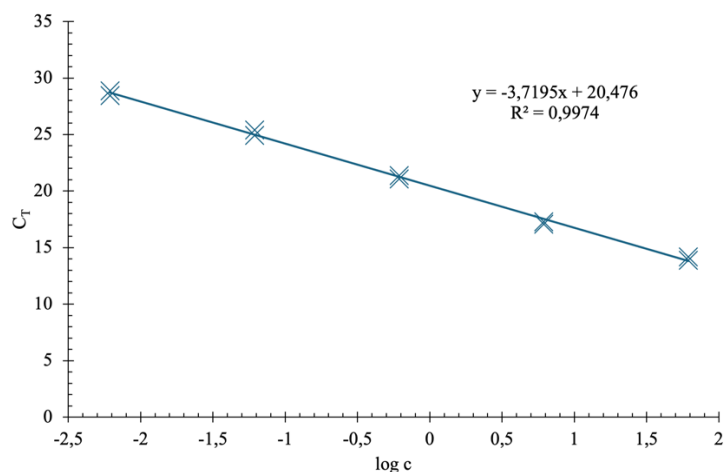
Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	20,78	a	21,83	42	13	24,13	m	20,12
	1	20,73	a	21,84		13	23,87	m	19,78
	2	20,59	b	21,02		14	24,54	n	19,86
	2	20,46	b	21,08		14	22,61	n	20,03
12	3	19,57	c	20,79	48	15	24,46	o	18,39
	3	19,10	c	20,38		15	25,06	o	18,72
	4	19,85	d	20,67		16	22,46	p	18,42
	4	19,85	d	20,63		16	23,97	p	19,15
18	5	21,38	e	22,72	54	17	22,34	q	19,20
	5	21,01	e	21,22		17	22,45	q	18,67
	6	20,38	f	19,84		18	21,37	r	19,15
	6	20,41	f	19,53		18	21,76	r	18,91
24	7	21,22	g	19,68	60	19	20,67	s	18,06
	7	20,82	g	19,96		19	20,60	s	18,95
	8	20,53	h	19,69		20	21,48	t	17,96
	8	20,66	h	20,08		20	21,59	t	19,36
30	9	22,08	i	20,53	66	21	21,86	u	18,10
	9	23,56	i	21,07		21	21,80	u	19,21
	10	22,17	j	20,44		22	20,86	v	19,09
	10	22,10	j	20,63		22	20,89	v	19,69
36	11	21,71	k	19,20	72	23	22,12	x	19,75
	11	21,93	k	19,49		23	21,96	x	19,87
	12	21,46	l	20,62		24	22,17	y	19,81
	12	21,66	l	21,02		24	22,31	y	21,48



Obrázek 26: Kalibrační křivka pro gen *phaR*

Tabulka 20: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *phaR*

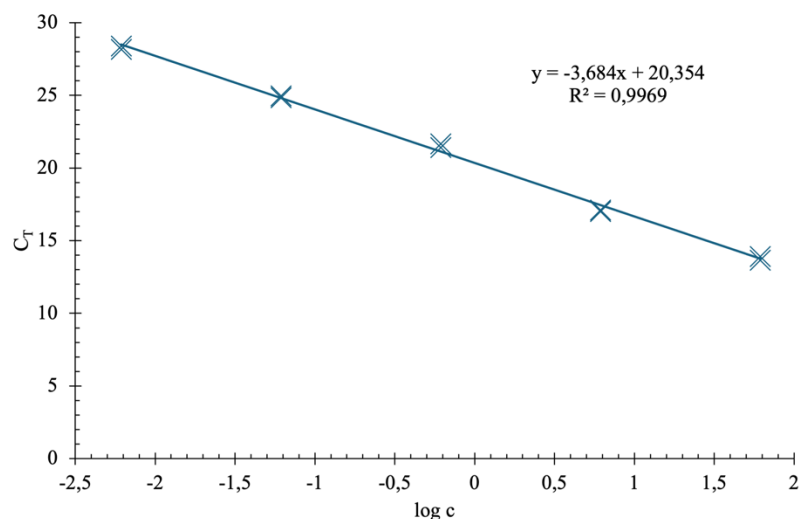
Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	21,11	a	21,49	42	13	22,97	m	19,90
	1	20,82	a	21,71		13	23,04	m	19,48
	2	20,03	b	21,90		14	21,07	n	19,93
	2	20,23	b	21,83		14	21,72	n	19,59
12	3	18,86	c	21,07	48	15	22,02	o	19,12
	3	19,65	c	21,09		15	23,11	o	19,08
	4	19,14	d	21,14		16	19,35	p	21,22
	4	19,49	d	21,15		16	21,58	p	21,85
18	5	21,53	e	22,04	54	17	20,43	q	20,84
	5	20,63	e	22,11		17	20,03	q	20,77
	6	20,02	f	20,42		18	20,98	r	19,50
	6	20,15	f	19,78		18	20,69	r	19,42
24	7	20,37	g	20,41	60	19	20,48	s	19,37
	7	20,62	g	20,27		19	20,32	s	19,19
	8	20,23	h	19,84		20	21,04	t	19,09
	8	20,56	h	20,11		20	20,97	t	19,83
30	9	22,43	i	20,93	66	21	21,43	u	19,73
	9	21,70	i	21,07		21	21,42	u	19,54
	10	21,32	j	20,48		22	20,87	v	19,19
	10	21,62	j	20,39		22	20,90	v	19,56
36	11	21,69	k	19,65	72	23	21,98	x	19,76
	11	21,38	k	19,43		23	21,64	x	19,61
	12	21,76	l	20,27		24	21,70	y	19,65
	12	21,30	l	20,48		24	21,61	y	19,81



Obrázek 27: Kalibrační křivka pro gen *phaP*

Tabulka 21: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *phaP*

Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	20,94	a	22,11	42	13	23,70	m	20,42
	1	20,77	a	21,94		13	23,63	m	20,32
	2	20,46	b	22,12		14	21,74	n	20,48
	2	20,30	b	21,69		14	21,54	n	20,20
12	3	19,13	c	20,95	48	15	22,40	o	19,54
	3	19,05	c	21,28		15	23,94	o	19,56
	4	19,77	d	21,28		16	21,23	p	21,65
	4	19,61	d	21,52		16	22,73	p	22,91
18	5	21,29	e	23,31	54	17	23,33	q	20,21
	5	20,88	e	22,61		17	23,09	q	21,88
	6	20,51	f	20,64		18	22,78	r	20,07
	6	20,33	f	20,58		18	21,95	r	19,79
24	7	20,79	g	20,63	60	19	20,65	s	20,25
	7	20,87	g	20,41		19	20,50	s	19,37
	8	20,55	h	20,04		20	21,13	t	20,76
	8	20,90	h	20,38		20	21,37	t	23,48
30	9	23,33	i	21,84	66	21	21,77	u	20,01
	9	22,12	i	21,35		21	21,70	u	20,01
	10	21,72	j	20,89		22	21,49	v	20,03
	10	21,54	j	20,78		22	21,33	v	20,07
36	11	21,63	k	19,93	72	23	22,12	x	19,97
	11	21,50	k	19,77		23	21,88	x	19,91
	12	20,95	l	20,71		24	21,84	y	19,77
	12	21,16	l	20,95		24	23,65	y	19,80



Obrázek 28: Kalibrační křivka pro gen *padR*

Tabulka 22: C_T hodnoty naměřené na obou médiích pro gen *padR*

Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T	Hodina	Vzorek	C_T	Vzorek	C_T
6	1	20,83	a	22,10	42	13	23,30	m	19,50
	1	20,56	a	21,78		13	23,00	m	19,47
	2	20,49	b	21,97		14	21,62	n	19,64
	2	20,17	b	21,68		14	21,64	n	19,61
12	3	19,46	c	20,41	48	15	22,82	o	18,89
	3	19,19	c	21,28		15	23,16	o	18,66
	4	19,32	d	20,86		16	21,36	p	18,92
	4	19,35	d	21,69		16	22,98	p	20,31
18	5	21,33	e	22,63	54	17	21,30	q	19,69
	5	20,84	e	22,04		17	22,48	q	19,92
	6	20,10	f	19,87		18	21,23	r	18,86
	6	19,98	f	19,91		18	21,27	r	18,81
24	7	20,79	g	19,98	60	19	20,09	s	18,68
	7	20,43	g	19,75		19	20,21	s	18,59
	8	20,24	h	19,63		20	21,00	t	18,79
	8	20,33	h	20,86		20	21,13	t	17,42
30	9	21,48	i	20,93	66	21	21,64	u	18,92
	9	21,67	i	20,55		21	21,47	u	19,13
	10	20,90	j	20,25		22	20,55	v	19,14
	10	21,17	j	20,37		22	20,47	v	19,24
36	11	21,56	k	19,32	72	23	21,50	x	19,40
	11	21,29	k	19,09		23	21,51	x	19,27
	12	21,08	l	20,07		24	21,60	y	19,25
	12	21,13	l	20,10		24	21,83	y	19,25