

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Příprava rekombinantního enzymu metabolismu sacharidů v sóji

Bakalářská práce

Petr Plevák

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Lenky
Dzurové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Souhrn

α -galaktosidasy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu galaktosových reziduí v oligosacharidech a polymerních galaktomananech, přičemž se liší svou substrátovou preferencí. V minulosti se α -galaktosidasy získávaly výhradně izolací z mikroorganismů, kdežto dnes jsou již díky metodám molekulární biologie připravovány rekombinantně v různých expresních systémech.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá přípravou kvasinkového expresního systému *Pichia pastoris* X-33 pro produkci rekombinantního enzymu α -galaktosidasy z genu *MelA* z *Bacillus subtilis* var. *natto*, která by se mohla využívat jako aditivum do krmných směsí pro hospodářská zvířata. Přídavek tohoto enzymu by usnadňoval hydrolýzu obtížně stravitelných oligosacharidů obsažených v sóji.

Experimentální část byla zaměřena na přípravu dvou konstruktů *pPICZaA::MelA* a *pGAPZaA::MelA* vhodných pro expresi v kvasinkách. Pro jejich získání byly použity metody molekulární biologie jako je transformace, izolace DNA, restrikce, ligace či PCR. Na závěr byly optimalizovány podmínky exprese rekombinantní α -galaktosidasy, přičemž její přítomnost v různých typech médií byla detekována pomocí SDS-PAGE nebo spektrofotometrickým měřením enzymatické aktivity.

Summary

α -galactosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of galactose residues in oligosaccharides and polymer galactomannans. They differ in substrate specificity. In the past, α -galactosidases were obtained just through isolation from microorganisms but nowadays they can be prepared recombinantly in various expression systems by the use of molecular biology methods.

Main ambition of the bachelor thesis is the preparation of yeast expression system *Pichia pastoris* X-33 for the production of recombinant enzyme α -galactosidase from *Bacillus subtilis* var. *natto* MelA gene. This enzyme could be used as an additive in fodder mixture for animals. The addition of this enzyme can facilitate the hydrolysis of bad-digestible oligosaccharides, which can be found in soybeans.

The experimental part is focused on preparation of two different constructs *pPICZ α A::MelA* and *pGAPZ α A::MelA*, which are suitable for expression in yeasts. They were prepared by the use of molecular biology methods such as transformation, DNA isolation, restriction, ligation and PCR. Finally, the expression conditions of recombinant α -galactosidase were optimized. The production of enzyme was monitored by SDS-PAGE in different media types or by spectrophotometric measurement of enzymatic activity.

Rád bych poděkoval mé vedoucí bakalářské práce RNDr. Lence Dzurové, Ph.D. za její čas, konzultace, trpělivý přístup a odborné vedení, a dále také děkuji Mgr. Jaromíru Kábrtovi za cenné rady při práci v laboratoři.

Obsah

Cíle práce.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Sacharidy	10
2.2 Metabolismus sacharidů	13
2.3 α -galaktosidasy	16
2.3.1 Charakterizace α -galaktosidas	16
2.3.2 Substráty α -galaktosidas	21
2.3.3 Biotechnologické využití α -galaktosidas.....	22
2.4 Sója jako zdroj sacharidů	24
2.4.1 Odstranění antinutričních faktorů ze sóji.....	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiál	27
3.1.1 Biologický materiál	27
3.1.2 Chemikálie.....	28
3.1.3 Přístroje.....	30
3.2 Metody	31
3.2.1 Příprava médií, selekčních ploten a zásobních roztoků antibiotik	31
3.2.2 Syntéza genu <i>MelA</i> z <i>B. subtilis</i> var. <i>natto</i>	32
3.2.3 Transformace plazmidu <i>pMK-RQ::MelA</i> do <i>E. coli</i> TOP10 pomocí tepelného šoku	33
3.2.4 Inokulace <i>E. coli</i> TOP10	33
3.2.5 Izolace plazmidové DNA	33
3.2.6 Stanovení koncentrace DNA	34
3.2.7 Restrikce plazmidové DNA.....	34
3.2.8 Agarosová elektroforéza.....	35
3.2.9 Izolace DNA z agarosového gelu	36

3.2.10	Ligace	36
3.2.11	Sekvencování.....	37
3.2.12	Příprava elektrokompetentních kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33.....	37
3.2.13	Linearizace.....	38
3.2.14	Přečištění linearizovaných konstruktů.....	38
3.2.15	Elektroporace kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33.....	38
3.2.16	Polymerázová řetězová reakce kolonií (Colony PCR).....	39
3.2.17	Stanovení fenotypů Mut ⁺ a Mut ^S u kvasinek <i>P. pastoris</i> X-33 <i>pPICZαA::Mela</i>	40
3.2.18	Optimalizace exprese genu MelA v <i>P. pastoris</i> X-33.....	40
3.2.19	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	42
3.2.20	Barvení gelu s Coomassie Brilliant Blue.....	43
3.2.21	Měření aktivity α-galaktosidasy	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
4.1	Příprava konstruktů <i>pPICZαA::Mela</i> a <i>pGAPZαA::Mela</i>	45
4.2	Příprava expresního systému <i>P. pastoris</i> X-33.....	49
4.3	Optimalizace exprese MelA v <i>P. pastoris</i> X-33	51
4.3.1	Exprese genu MelA z vektoru pGAPZαA.....	51
4.3.2	Exprese genu MelA z vektoru pPICZαA.....	53
4.3.3	Měření aktivity α-galaktosidasy	54
5	ZÁVĚR.....	57
6	REFERENCE	58
6.1	Literární zdroje	58
6.2	Internetové zdroje	62
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma: Sacharidy a jejich metabolismus; enzymy v něm aktivní se zaměřením na α -galaktosidasy a sója luštinatá jako zdroj sacharidů.
- Příprava rekombinantní α -galaktosidasy MelA z *Bacillus subtilis* var. *natto* v kvasinkovém expresním systému.
- Klonování genu z *Bacillus subtilis* var. *natto*, označeného jako MelA, do expresních vektorů pro rekombinantní kvasinkový systém *Pichia pastoris* X-33.
- Optimalizace exprese rekombinantní α -galaktosidasy v *Pichia pastoris* X-33.
- Měření aktivity α -galaktosidasy.

1 ÚVOD

Sója luštinatá se hojně využívá jako finančně dostupná složka krmných směsí pro hospodářská zvířata. Je bohatým zdrojem bílkovin, sacharidů a dusíkatých látek. Na druhou stranu obsahuje také relativně velké množství antinutričních látek, které brání plnému využití všech živin. Jako hlavní problém se jeví přítomnost antitrypsinového faktoru a nestravitelných oligosacharidů, především rafinosy, stachyosy a verbaskosy. Tepelnou úpravou se účinek antitrypsinového faktoru snižuje, ale přílišné tepelné zpracování má negativní vliv na kvalitu bílkovin. Nestravitelné oligosacharidy prochází trávicím traktem monogastričních zvířat až do tlustého střeva, kde je mohou štěpit mikroorganismy produkující α -galaktosidasu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou definovány jako polyhydroxyderiváty alkoholů (aldehydů nebo ketonů) obsahující tři a více uhlíkatých atomů (Voet *et al.*, 2005). V živých organismech plní strukturní a metabolickou funkci. Základní sacharidovou jednotkou je glukosa. Rostliny ji získávají fotosyntézou z oxidu uhličitého a vody (viz Schéma 1). Ukládat ji mohou ve formě škrobu. Živočichové přijímají rostlinné sacharidy, tuky a bílkoviny v potravě, z nichž si mohou následně syntetizovat některé sacharidy sami nebo je mohou uložit ve formě glykogenu (viz obrázek 2).

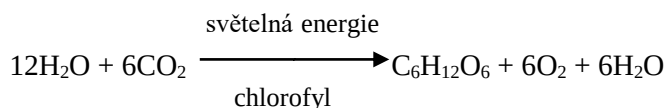
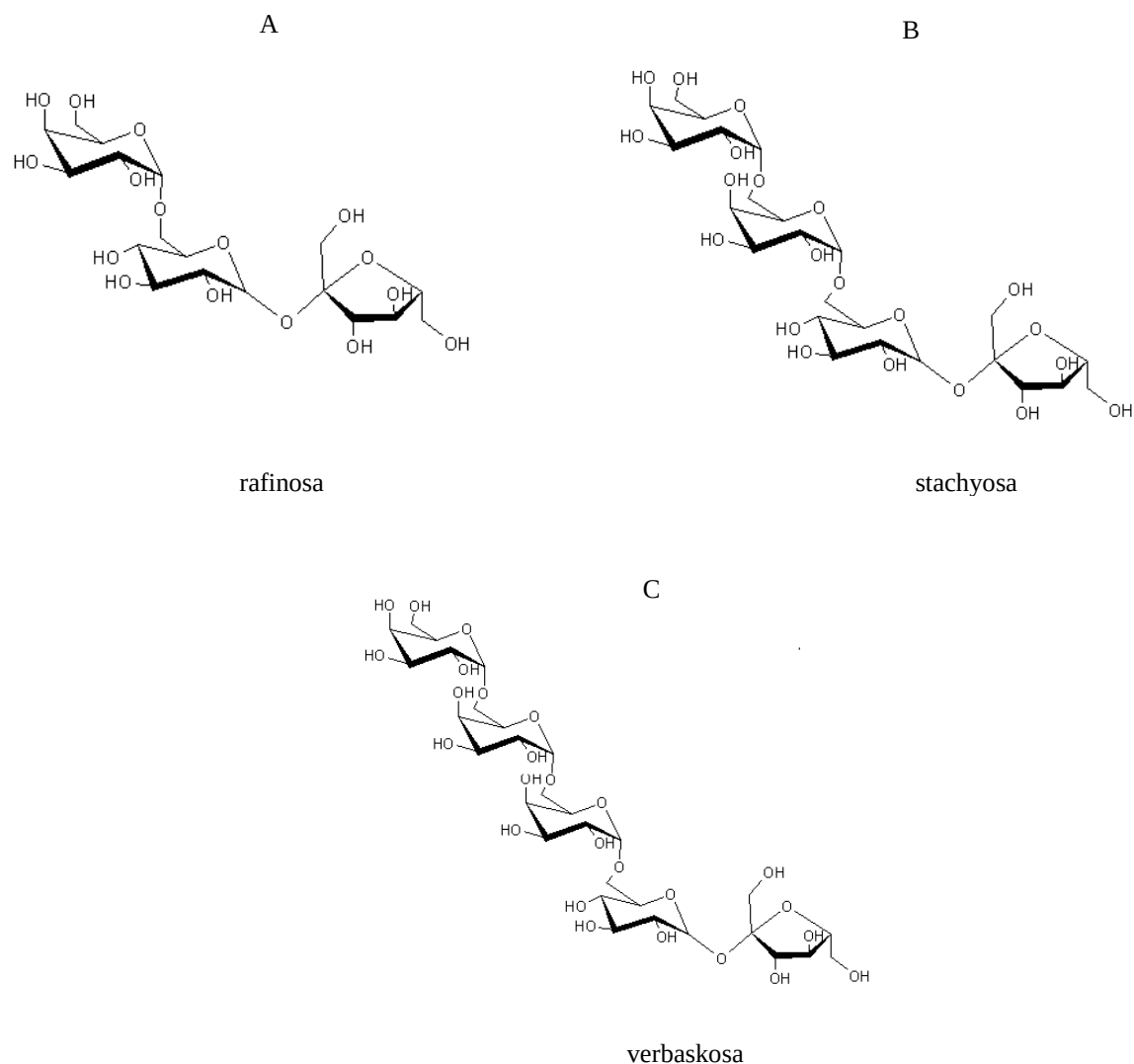


Schéma 1 – Souhrnná rovnice fotosyntézy

Monosacharidy představují nejjednodušší formu sacharidů. Jsou definovány jako sacharidy, které již nemohou být hydrolyzovány na jednodušší sacharidy. Podle počtu atomů uhlíku je dělíme na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy, heptosy nebo oktasy. Dle přítomnosti aldehydové či ketonové skupiny se pak dělí na aldosity a ketosy. Patří sem například glukosa, fruktosa či ribosa.

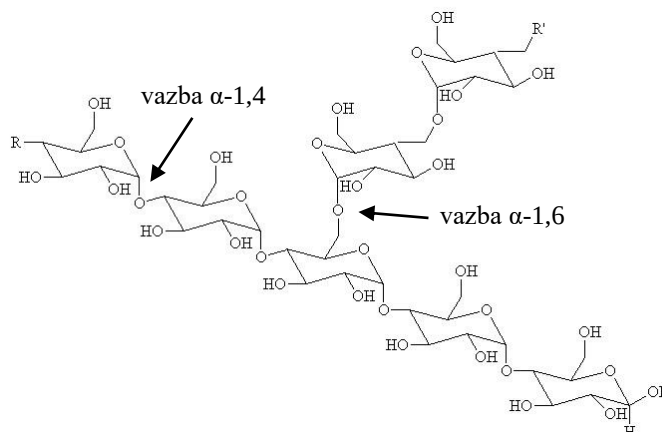
Monosacharidy a oligosacharidy se souhrnně označují jako cukry. Oligosacharidy se skládají z 2-10 monosacharidových jednotek. Pokud se O-glykosidové vazby hemiacetalového hydroxyly účastní pouze jedna jednotka, jedná se o redukující sacharid. Pokud se však O-glykosidové vazby účastní obě monosacharidové jednotky, jedná se o neredukující sacharid. Mezi oligosacharidy se řadí například rafinosa, stachyosa, či verbaskosa (viz obrázek 1) (Mayes, 1998).



Obrázek 1 – Strukturní vzorce oligosacharidů. A – rafinosa, B – stachyosa, C – verbaskosa.

Polysacharidy, označované také jako glykany, obsahují více než 10 jednotek monosacharidů. Dle počtu monosacharidových jednotek, na které jsou hydrolyzovány, se označují jako pentosany nebo hexosany. K biologicky nejvýznamnějším polysacharidům patří škrob, který představuje velmi důležitý zdroj sacharidů v rostlinné potravě. Tvoří ho α -glykosidové řetězce amylosy a amylopektinu, což jsou větvené řetězce 24-30 glukosových jednotek spojené α -(1,4) nebo α -(1,6) vazbami v místech větvení. U živočichů je zásobní polysacharid tvořen řetězci 10-18 α -D-glukopyranosových jednotek spojených α -(1,4) vazbami, které jsou navzájem spojeny α -(1,6) vazbami v polymery glykogenu (viz obrázek 2). Další je celulóza, která představuje hlavní složku nerozpustných rostlinných pletiv. Pro mnoho savců je nestravitelná v důsledku absence

enzymů trávicího její β -D-glukopyranosové jednotky spojené β -(1,4) vazbami. Býložravci proto využívají symbiotických mikroorganismů ve střevech, které tyto hydrolasy produkují (Hughes, 1975).



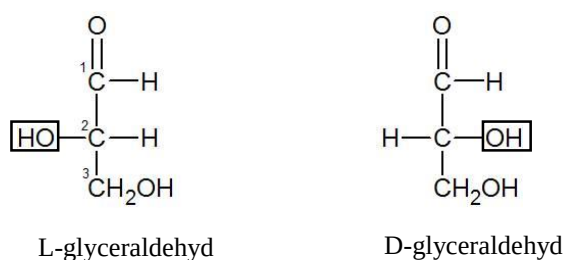
Obrázek 2 – Glukosové jednotky glykogenu spojeny α -(1,4) a α -(1,6) vazbami (převzato z: https://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/carbo%20metab%20cases/glycogen%20metab/Glycogen%20biochemistry.htm, 3. 5. 2016).

Sacharidy jsou schopny vytvářet sloučeniny s jinými látkami i mezi sebou navzájem. Patří sem glykoproteiny (proteiny s cukernou složkou) a glykolipidy (lipidy s cukernou složkou), které se vyskytují v buněčných membránách a tkáních, kde mají strukturální, receptorové, signalizační nebo enzymatické funkce.

Existují také deriváty sacharidů zvané glykosidy, které vznikají kondenzací hydroxylové skupiny na anomerním atomu uhlíku monosacharidové jednotky a druhé molekuly, kterou může být jiný sacharid nebo v případě aglykonů methanol, sterol, glycerol, fenol nebo dusíkaté báze. Jestliže je druhou kondenzovanou skupinou hydroxylová skupina, vzniká O-glykosidová vazba, jestliže jí je amin, vzniká N-glykosidová vazba. Názvosloví glykosidů se odvíjí od sacharidových jednotek, kterými jsou tvořeny. Pokud je touto jednotkou například glukosa, jedná se o glukosid, galaktosa – galaktosid apod. (Rees, 1977).

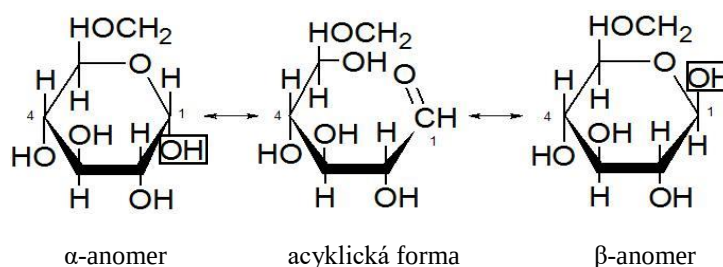
Sacharidy mohou vykazovat několik forem isomerie. Konstituční isomery mají stejný sumární vzorec, ale liší se svým vnitřním uspořádáním uhlíkatého řetězce. Sloučeniny, které mají stejný strukturní vzorec, ale odlišné prostorové uspořádání se nazývají stereoisomery. Počet možných stereoisomerů závisí na počtu chirálních atomů uhlíku. Tato chirální centra jsou také zodpovědná za optickou aktivitu. Pravotočivé látky stáčí rovinnu polarizovaného světla ve směru chodu hodinových ručiček a označují se (+).

Levotočivé látky stáčí rovinu polarizovaného světla proti směru chodu hodinových ručiček a mají označení (-). Směs, která obsahuje stejné množství (+) a (-) látek není opticky aktivní. D a L isomerie rozlišuje prostorové uspořádání sloučenin čiže objekt a jeho zrcadlový obraz. Zda sacharid patří k D nebo L řadě se určuje na základě Fischerovy projekce z orientace -H a -OH skupiny. Pokud má sacharid -OH skupinu napravo, jedná se o D isomer, pokud ji má nalevo, jedná se o L isomer (obrázek 3). Enzymy, které jsou zapojeny v metabolismu těchto sloučenin, působí specificky na danou konfiguraci (Mayes, 1998).



Obrázek 3 – L a D isomer glyceraldehydu. Fisherova projekce.

V roztocích se sacharidy vyskytují v podobě kruhových molekul. Kombinací aldehydové a alkoholové skupiny vzniká hemiacetálová kruhová struktura aldosa (u ketos hemiketalová). V závislosti na pozici -OH skupiny na anomerním atomu uhlíku v kruhové formě rozlišujeme α - a β - anomery sacharidů (viz obrázek 4) (Mayes, 1998).



Obrázek 4 – α - a β - anomery glukosy (převzato od Mayes *et al.*, 1998).

2.2 Metabolismus sacharidů

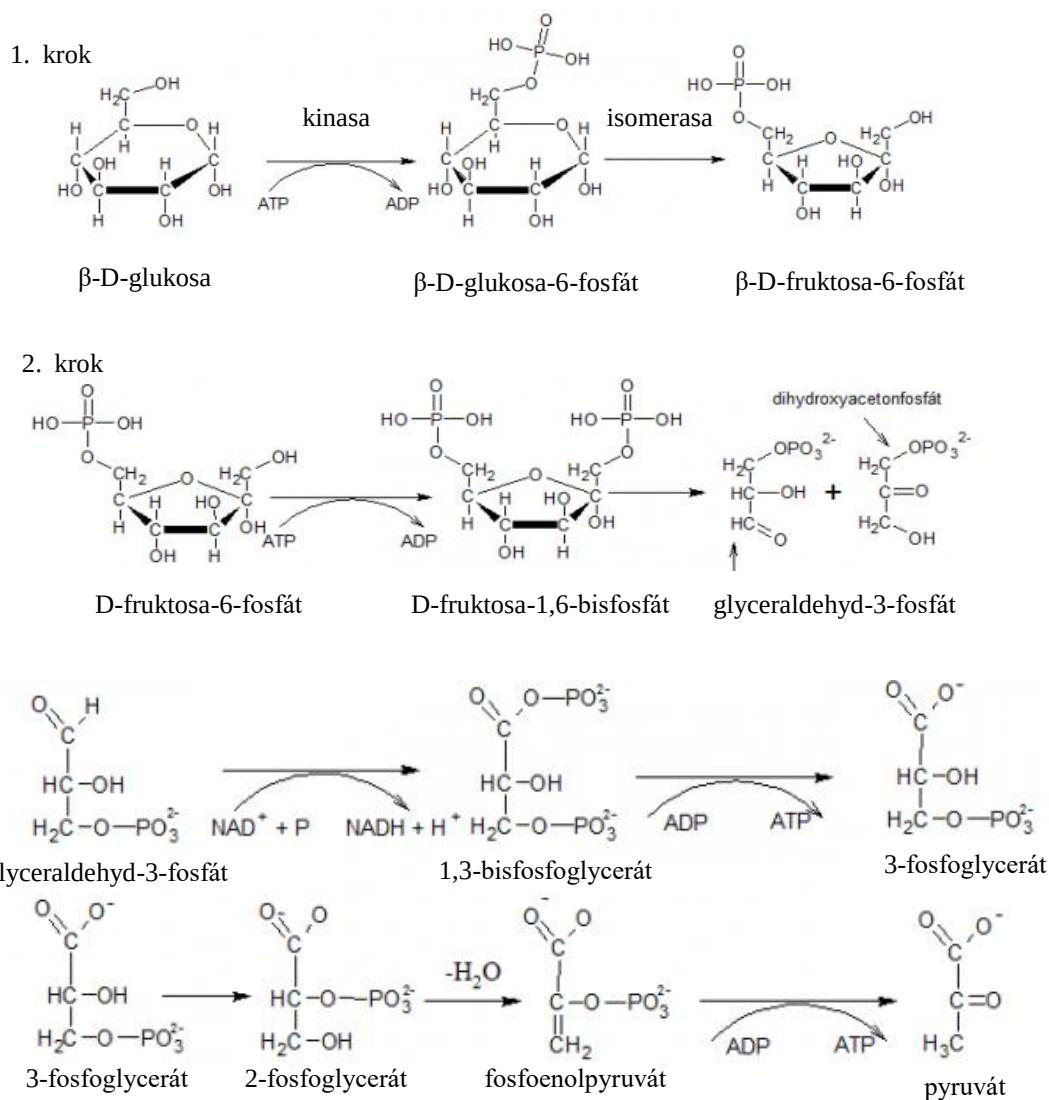
Obecně je metabolismus považován za soubor látkových a energetických přeměn. Tyto přeměny mohou být nejen rozkladné (katabolismus), ale také syntetizující (anabolismus). Účelem metabolismu sacharidů pro heterotrofní organismy je příjem a nakládání s energií. V potravě jsou zdrojem energie především sacharidy, a to ve formě mono-, oligo-, i polysacharidů. U savců probíhá trávení hydrolytickým štěpením

glykosidické vazby za přítomnosti specifických enzymů až na základní monosacharidové jednotky jako je například glukosa, fruktosa nebo galaktosa (Campbell a Reece, 2008).

Polysacharidy škrob a glykogen se začínají rozkládat již v ústní dutině α -amylasou ze slin. Dále pak α -amylasa z pankreatu štěpí α -(1,4) vazbu za vzniku disacharidových podjednotek maltosy, které jsou maltasou štěpeny na dvě molekuly glukosy. V tenkém střevě se vlivem specifických enzymů štěpí i další disacharidy. Příkladem může být sacharasa, která štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu nebo laktasa, která štěpí laktosu na glukosu a galaktosu.

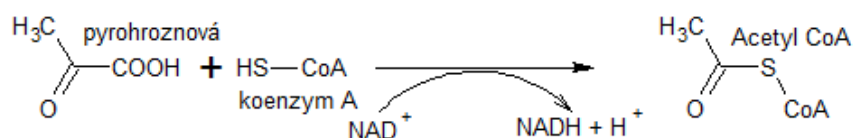
Rostlinná složka potravy obsahuje celulosu, hemicelulosu a další polysacharidy, které jsou součástí buněčné stěny rostlinných buněk. Sacharidové jednotky jsou zde pospojovány vazbou β -(1,4). Luštěniny obsahují oligosacharidy spojené vazbou α -(1,6) (např. melibiosa, rafinosa, stachyosa). Enzymy štěpící tyto vazby (např. celulasa, α -galaktosidasa) si savci sami syntetizovat neumí a museli proto tomu přizpůsobit stavbu své trávicí soustavy. V předžaludku, ve slepém a tlustém střevě žijí symbiotické anaerobní organismy, které potřebné enzymy dokáží produkovat a tím je napomáhají savcům rozkládat (Hill *et al.*, 2008).

Vstřebání rozštěpených sacharidů následně probíhá přes stěnu tenkého střeva. Glukosa je rozváděna krví do tkání a v jednotlivých buňkách je dále rozkládána anaerobní glykolýzou na dvě molekuly pyruvátu za celkového zisku dvou molekul ATP a NADH (obrázek 5). V prvním kroku jsou monosacharidy přeměněny na D-fruktosa-6-fosfát. Navázáním fosfátu se spotřebuje jedna molekula ATP. V druhém kroku dochází ke štěpení šestiuhlíkatého D-fruktosa-6-fosfátu za vzniku dvou molekul glyceraldehyd-3-fosfátu. Ve třetím kroku se triosy fosforylují a následně oxidují za vzniku pyruvátu a uvolnění čtyř molekul ATP a dvou molekul $\text{NADH} + \text{H}^+$. 2 molekuly ATP jsou však v průběhu reakce spotřebovány, takže celkový energetický zisk představuje 2 molekuly ATP (Holeček, 2006).



Obrázek 5 – Glykolýza (převzato z: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Metabolismus_Sacharid%C5%AF; 21. 4. 2016).

Pyruvát, vzniklý glykolýzou, je u savců následně odbouráván aerobně a to oxidační dekarboxylací na acetyl CoA (viz obrázek 6), který pak vchází do Krebsova cyklu a dýchacího řetězce. Výslednými produkty z 1 molekuly glukosy jsou tedy 4 molekuly CO_2 a získaná energie v podobě 6 molekul NADH, 2 molekul FADH_2 a 2 molekul ATP (Karlson, 1981).



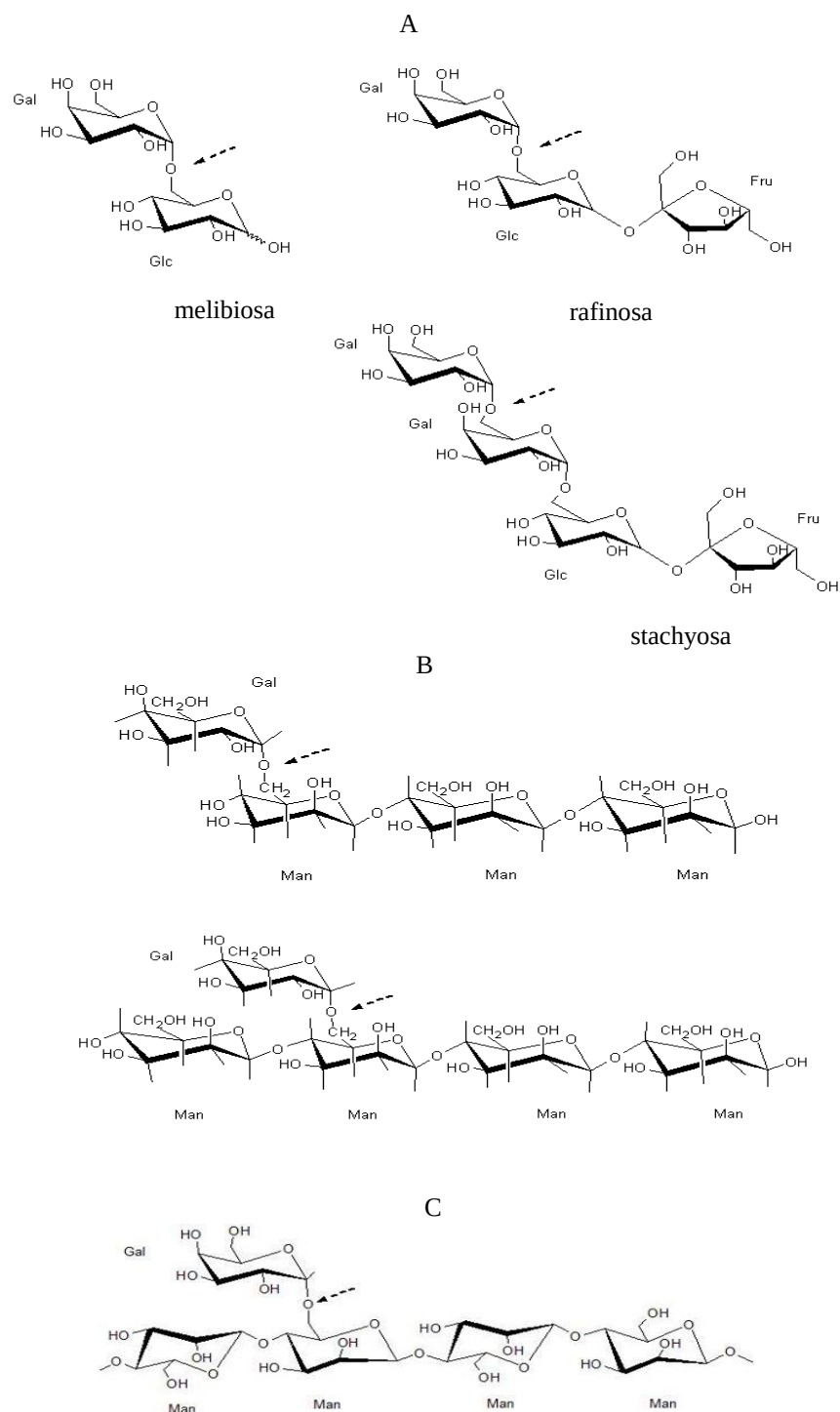
Obrázek 6 – Aerobní odbourávání pyruvátu (převzato z: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Metabolismus_Sacharid%C5%AF; 21. 4. 2016).

2.3 α -galaktosidasy

2.3.1 Charakterizace α -galaktosidas

α -galaktosidasy (α -D-galaktosid-galaktohydrolasy, EC 3.2.1.22) jsou enzymy katalyzující hydrolýzu neredukujících α -1,6-galaktosových zbytků v oligosacharidech (obrázek 7A), galaktomanan-oligosacharidech (obrázek 7B) a galaktomanan-polysacharidech (obrázek 7C) (Ishiguro *et al.*, 2001). Díky této vlastnosti jsou významné pro jejich široké uplatnění v biotechnologiích, lékařství, různých odvětvích průmyslu (potravinářství, zemědělství a papírnictví) pro odstranění rafinosy a stachyosy (Katrolia *et al.*, 2014). Některé α -galaktosidasy jsou také schopny transglykolace přenosem galaktosy z dárce na molekuly vhodného příjemce (Spangenberg *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005).

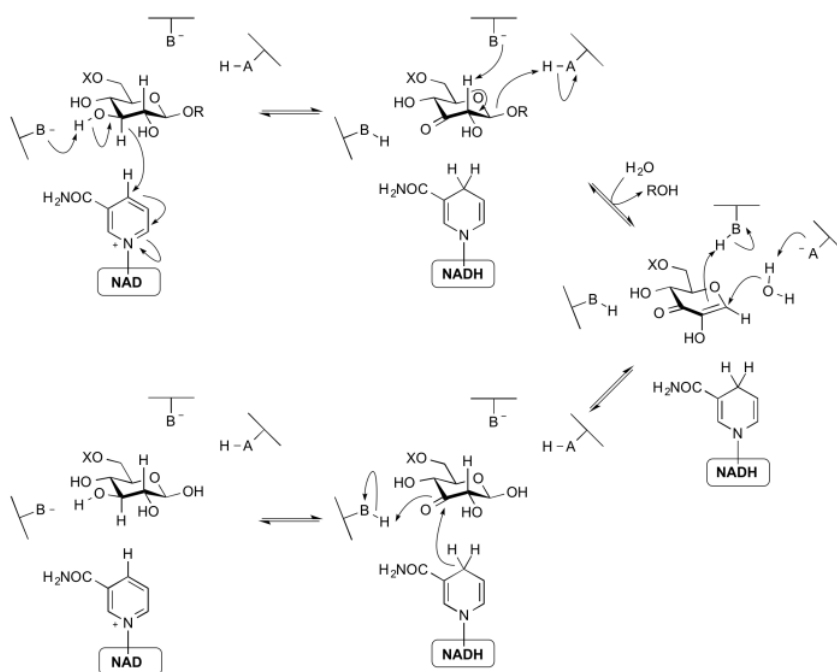
V literatuře se uvádí několik typů α -galaktosidas (Petek a Dong, 1961; Dey a Pridham, 1969; Balasubramaniam *et al.*, 1974; Williams *et al.*, 1977), kterých klasifikace je založena na základě substrátové specifity nebo sekvenční podobnosti. První kritérium rozděluje tyto enzymy na dvě skupiny: skupina I a II. Substráty enzymů skupiny I jsou oligosacharidy (rafinosové cukry), zatímco substráty enzymů skupiny II jsou polysacharidy galakto(gluko)manany (Comfort *et al.*, 2007). Na základě sekvence a strukturních podobností se α -galaktosidasy řadí do jedné ze čtyř rodin glykosylových hydrolas (GH) a to GH4, GH27, GH36 a GH57 (Henrissat a Bairoch, 1993). GH jsou odpovědné za hydrolýzu a transglykosylaci glykosidických vazeb. Pro jejich široké využití v biotechnologiích a v biomedicině, představují jedny z nejpodrobněji zkoumaných enzymatických rodin (Brandi *et al.*, 2008).



Obrázek 7 – Substráty α -galaktosidas: A – oligosacharidy, B – galaktomanan-oligosacharidy, C – galaktomanan-polysacharidy. Šipky označují štěpná místa pro α -galaktosidasu. Galaktosa (Gal), glukosa (Glc), fruktosa (Fru), manosa (Man).

Většina enzymů patřících do rodiny GH4 má bakteriální původ jako i například α -galaktosidasa z *Bacillus subtilis* var. *natto*. Existují však i zástupci z řad archeí (např. *Thermophilum* sp.) (Cantarel *et al.*, 2009). Tato rodina zahrnuje nejen α - (α -glukosidasa, α -galaktosidasa, α -glukuronidasa) ale i β -glykosidasy (6-fosfo- β -glukosidasa). Na rozdíl

od jiných enzymatických rodin, se některé GH4 enzymy navzájem liší v substrátové specifitě (Cantarel *et al.*, 2009; Henrissat a Davies, 1997). Některé preferují fosforylované substráty před nefosforylovanými (Henrissat a Davies, 1997; Henrissat a Bairoch, 1996). Jsou schopny hydrolyzovat přirozené substráty o různé anomerní konfiguraci, což nebylo u dalších GH rodin dosud prokázáno (Thompson *et al.*, 1994; Bouma *et al.*, 1997; Raasch *et al.*, 2000; Lodge *et al.*, 2003). GH4 představuje jedinou rodinu, u které bylo prokázáno, že enzymy v ní jsou schopny katalyzovat hydrolyzu neaktivovaných thioglykosidových substrátů (Yip a Withers, 2006). Tyto enzymy nevyužívají klasického Koshlandova mechanismu s dvojitým přesunem (viz obrázek 9) (Koshland, 1953), ale hydrolyzují substráty mechanismem závislým na NAD kofaktoru (obrázek 8), který probíhá přes kroky: oxidace, eliminace, adice a redukce prostřednictvím aniontových přechodových stavů. V počáteční fázi dochází k oxidaci 3-hydroxylylu na substrátu NAD kofaktorem vázaným na enzym. Tím se zvyšuje kyselost C2 protonu tak, že může dojít k jeho odstranění pomocí enzymatické báze. Adicí vody dochází ke vzniku α - a β - nenasycených meziproductů na anomerním centru. Poté redukcí ketonu vzniká C3 cukerný produkt. I když je glykosidická vazba štěpena mechanismem eliminace, celková reakce se považuje za hydrolyzu (Yip a Withers, 2006).

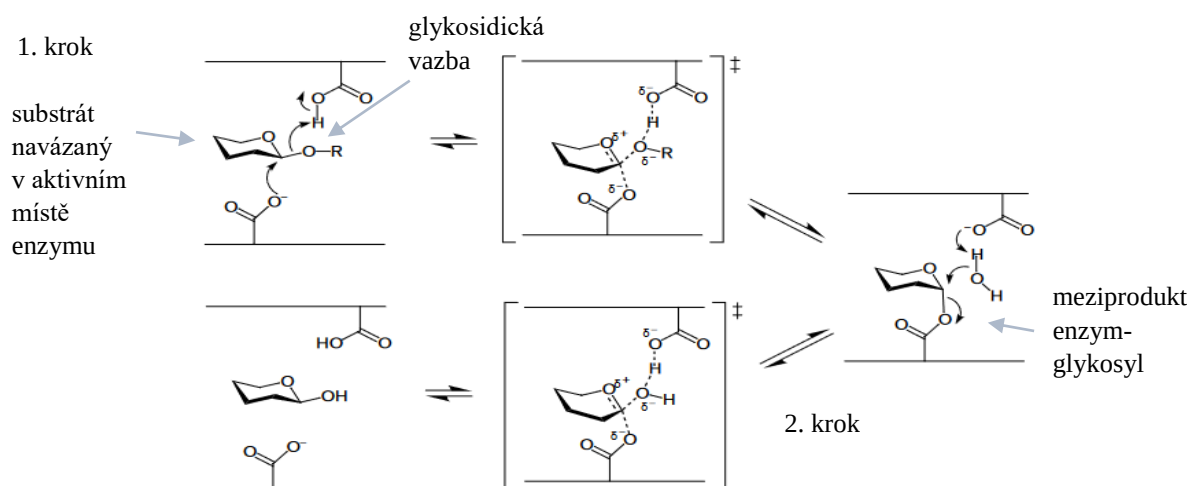


Obrázek 8 – Mechanismus závislý na NAD kofaktoru pro 6-fosfo- β -glukosidasu (převzato z: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#NAD-dependent_hydrolysis; 15. 4. 2016).

Rodina GH27 zahrnuje jak bakteriální tak i většinu eukaryotních α -galaktosidas (Naumoff *et al.*, 2004). Do této enzymatické rodiny patří mimo jiné i lidská α -galaktosidasa A (Garman, 2006; Garman, 2007). Pomocí protonové nukleární magnetické rezonanční spektroskopie na p-nitrofenyl- α -galaktopyranosidu hydrolyzovaném α -galaktosidasou z plísně *Phanerochaete chrysosporium* byla dokázána specifická anomerní konfigurace substrátů (Brunner, 1999). GH27 enzymy hydrolyzují substráty klasickým Koshlandovým mechanismem dvojitého posunu (Sinnott, 1990), který zahrnuje tvorbu kovalentního meziprojektu glykosyl-enzym (obrázek 9) (Vocadlo *et al.*, 2001).

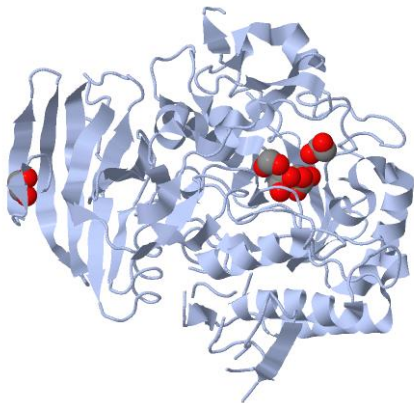
Na rozdíl od GH27 rodiny GH36 rodina zahrnuje enzymy s α -galaktosidasovou aktivitou z archeí, bakterií i eukaryotních organismů (CAZypedia: <http://www.cazy.org/GH36.html>, 28. 3. 2016). Do této rodiny patří také několik houbových enzymů z *Aspergillus niger* (Ademark *et al.*, 2001), *Gibberilla* sp. (Cao *et al.*, 2009b), *Absidia corymbifera* (Baik *et al.*, 2000), *Penicillium* sp. F63 (Mi *et al.*, 2007) nebo *Rhizopus* sp. (Cao *et al.*, 2009a), které se liší od enzymů rodiny GH27 a jsou daleko více podobné právě bakteriálním α -galaktosidasám rodiny GH36 (Comfort *et al.*, 2007).

Organizace GH do rodin nám poskytuje více informací o katalytickém mechanismu enzymů. Výsledky biochemických analýz poukazují na vysokou podobnost mezi GH36 α -galaktosidasami (například α -galaktosidasa z *Thermotoga maritima*, TmGalA) a enzymy rodiny GH27. Enzymatické rodiny GH27 a GH36 společně tvoří skupinu GH-D, která sdílí společný původ a katalytický mechanismus (Comfort *et al.*, 2007). Obě tyto enzymatické rodiny katalyzují štěpení glykosidické vazby přes Koshlandův záchytný mechanismus dvojího posunu se dvěma asparagovými kyselinami působícími jako katalytická rezidua. V prvním katalytickém kroku, také nazývaném glykosylační, vzniká meziprojekt enzym-glykosyl za uvolnění sacharidové složky. Ve druhém katalytickém kroku (deglykosylační krok) je meziprojekt rozložen exogenním nukleofilem (molekulou vody) na glykan a katalytické reziduum enzymu (obrázek 9) (Rye *et al.*, 2000).



Obrázek 9 – Koshlandův mechanismus. Hydrolýza glykosidické vazby pomocí Koshlandova mechanismu dvojího přesunutí elektronů, který probíhá u rodin GH27, GH36 a GH57 (převzato z: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Classical_Koshland_retaining_mechanism, 15. 4. 2016).

Eukaryotické α -galaktosidasy GH27 jsou funkční v monomerní formě, zatímco enzymy GH36, zejména prokaryotického původu, jsou uspořádány jako multimerní komplexy s velkou molekulovou hmotností (Cao *et al.*, 2009b). V roce 2002 Lesley *et al.* vyřešil první trojrozměrnou strukturu zástupce této rodiny a to pro α -galaktosidasu TmGalA z *T. maritima* (obrázek 10). Porovnání těchto dat s již známými strukturami enzymů GH27 odhalilo homologní aktivní místa, včetně dvou klíčových katalytických zbytků kyseliny asparagové. Následná podrobná fylogenetická analýza skupiny GH-D, který původně zahrnoval pouze GH36 a GH27, ukázala, že enzymy GH36 z archeí jsou více podobné rostlinným α -galaktosidasám, než bakteriálním nebo houbovým. Z krystalografických studií proteinů termofilních bakterií (TmGalA) vyplynula také strukturní podobnost GH31 skupiny s GH36 a GH27, což vedlo k sjednocení těchto tří rodin do společné skupiny GH-D (Ernst *et al.*, 2006).



Obrázek 10 – 3D krystalová struktura α -galaktosidasy (EC 3.2.1.22) z *T. maritima*. Rozlišení 2.34 Å (PDB kód: 1zy9, převzato z <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/1zy9>; 15. 4. 2016).

α -galaktosidasy z vláknitých hub mají nízké pH optimum (pH 4,0-6,0), což je dělá nepostradatelnými při práci v kyselém prostředí při různých teplotách (Mi *et al.*, 2007, Similä *et al.*, 2010). Například α -galaktosidasa z *Penicillium* sp. (pH 5,5-6,5) a *Penicillium purpurogenum* (pH 4,0-6,0) je aktivní pouze v kyselém až neutrálním prostředí (Shibuya *et al.*, 1998; Mi *et al.*, 2007). Glykosylové hydrolasy z *Penicillium* sp. a *Rhizopus* sp. rodiny GH36 vykazují nízká teplotní optima (40 a 50 °C, v tomto pořadí) (Mi *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009a) v porovnání s α -galaktosidasami izolovanými z termofilních hub *Talaromyces lanuginosus* a *Talaromyces emersonii*, které jsou aktivní právě při vysokých teplotách 60-70 °C (Rezessy-Szabo *et al.*, 2007; Similä *et al.*, 2010).

Rodina GH57 vznikla v roce 1996 (Henrissat a Bairoch, 1996) na základě dvou sekvencí α -amylas, které se lišily od typických α -amylas rodiny GH13 (MacGregor *et al.*, 2001). Jednalo se o termostabilní eubakteriální amylasu z *Dictyoglomus thermophilum* (Fukusumi *et al.*, 1988) a vysoce termostabilní archeální amylasu z *Pyrococcus furiosus* (Laderman *et al.*, 1993). K rozšíření této skupiny došlo především díky dalšímu sekvenování genomů. Dnes je známo více než tisíc zástupců prokaryotického původu v poměru archea:bakterie – 1:4 (Cantarel *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2014, Blesak a Janecek, 2012). Aktivita GH57 proteinů je založena na zachování anomerní konfigurace přes klasický Koshlandův zachytý mechanismus s dvojitým posunem.

2.3.2 Substráty α -galaktosidas

α -galaktosidasy specificky katalyzují hydrolýzu α -(1,6)-vázaných galaktosových zbytků v oligo- a polysacharidech (Similä *et al.*, 2010). Nekatalyzují však hydrolýzu β -vázaných derivátů.

Podle substrátové specifity mohou být α -galaktosidasy rozděleny do dvou skupin (Dey *et al.*, 1993). První skupina zahrnuje α -galaktosidasy vykazující aktivitu pouze s oligosacharidy s nízkým stupněm polymerizace (melibiosy, rafinosy, stachyosy) a s krátkými fragmenty galakto(gluko)mananů. Druhá skupina je tvořena enzymy preferujícími polymerní substráty a krátké oligosacharidy (Comfort *et al.*, 2007).

α -galaktosidasy z rodiny GH36 specificky hydrolyzují malé oligosacharidy. Nepůsobí však na polymerní galakto(gluko)manany (Mi *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2010). Neschopnost enzymů rodiny GH36 štěpit polymerní substráty je pravděpodobně způsobena jejich velkou, multimerní strukturou, která omezuje přístupnost polymerních

substrátů k aktivnímu místu enzymu (Katrolia *et al.*, 2012). Naproti tomu, rodina GH27 hydrolyzuje galaktomanany za uvolnění galaktosy (Jindou *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

Similä *et al.* (2010) ve své studii uvádějí, že rekombinantní α -galaktosidasa z *T. emersonii* vykazuje nejvyšší aktivitu vůči oligosacharidům di-galaktomanpentose a stachyose. Aktivita vůči verbaskose a polysacharidovým substrátům (karbové galaktomanany, karubin a guarová guma) byla výrazně nižší.

α -galaktosidasa z termofilní houby *Rhizomucor miehei* vykazuje vyšší aktivitu vůči syntetickým substrátům (para-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid: pNPG, ortho-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid: oNPG) ve srovnání s přírodními substráty (melibiosa, rafinosa, stachyosa) (Katrolia *et al.*, 2012). Nejvyšší substrátovou specifitu vykazuje tato α -galaktosidasa pro paranitrofenyl (pNP) α -D-galaktopyranosid. S pNP β -D-galaktopyranosidem, pNP α -D-mannopyranosidem, ani pNP α -D-glukopyranosidem katalytická reakce neprobíhá. V přítomnosti přírodních substrátů se její aktivity vůči pNP α -D-galaktopyranosidu výrazně snižuje (u stachyosy o 31,3 %, u rafinosy o 13,5 % a u melibiosy o 5,0 %).

Se zdokonalováním metod purifikace a identifikace bylo prokázáno, že α -galaktosidasy z odlišných organismů mohou preferovat také odlišné typy substrátů, studie probíhaly konkrétně u kávového zrna (*Coffea arabica*) (Petek a Dong, 1961), bobu obecného (*Vicia faba*) (Dey a Pridham, 1969), kokosu (*Cocos nucifera*) (Balasubramaniam *et al.*, 1974) a u toliky vojtěšky (*Medicago sativa*) (Williams *et al.*, 1977). α -galaktosidasy z naklíčených semen vikve seté (*Vicia sativa*) (Petek *et al.*, 1969) hydrolyzují rafinosu, planteosu, stachyosu a galaktinol. S melibiosou a galaktomanany nevykazují aktivitu. Čočka jedlá (*Lens culinaris*) obsahuje α -galaktosidasy v období dormance semen, které jsou schopny hydrolyzovat rafinosu, v menší míře melibiosu, ale ne galaktomanany (Dey a Wallenfels, 1974). U α -galaktosidas byla také prokázána schopnost přenosu galaktosylové skupiny na akceptorové cukerné složky (Anagnostopoulos *et al.*, 1954; Anagnostopoulos *et al.*, 1955; Courtois a Petek, 1957; Li a Shetlar, 1964; Dey a Pridham, 1972).

2.3.3 Biotechnologické využití α -galaktosidas

V posledních letech byly α -galaktosidasy intenzivně studovány především pro jejich možné využití v biomedicině a v biotechnologickém výzkumu. Modifikovaná lidská α -galaktosidasa A byla použita při léčbě pacientů s poruchou lysozomálního ukládání,

známou jako Fabryho nemoc, při níž vede deficit lysozomální α -galaktosidasy A k akumulaci glykolipidů s následnými multisystémovými symptomy. Tato porucha je vázána na chromozom X a může vést až k předčasnému úmrtí jak u homozygotních, tak i u heterozygotních jedinců (Rozenfeld, 2009).

α -galaktosidasy byly také použity k modifikaci glykomarkerů krevních skupin na erytrocytech. Odstraněním α -(1,3) vázaných galaktosových jednotek z antigenů na buňkách krevní skupiny B pomocí rekombinantní α -galaktosidasy byly získány buňky typu 0 (Ollson *et al.*, 2004), které byly úspěšně testovány transfúzí krve u opic makak rhesus (*Macaca mulatta*) a u gibbonů (*Hylobates* sp.) (Zhang *et al.*, 2007).

V cukrovarnickém průmyslu se α -galaktosidasy používají pro zvýšení výnosů sacharosy, kde odstraňují rafinosu, která brání její krystalizaci (Linden *et al.*, 1982). Významné je také využití při úpravě potravin a krmiv vyráběných z rostlin čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Hydrolýzou cukrů rafinosového typu a hemicelulolytických galaktomananů, které jsou obsaženy v sóji, můžeme zlepšit stravitelnost a nutriční hodnotu produktů z těchto rostlinných zdrojů, neboť tyto zpravidla vyvolávají gastrointestinální potíže a nadýmání (Falkoski *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 2006). Kromě toho byly α -galaktosidasy využívány k bělení měkkého papíru (Clarke *et al.*, 2000) a k výrobě biopaliv z lignocelulosoové biomasy, kam patří odpady ze zemědělství, dřevařství a účelově pěstované energetické plodiny (Gray *et al.*, 2006).

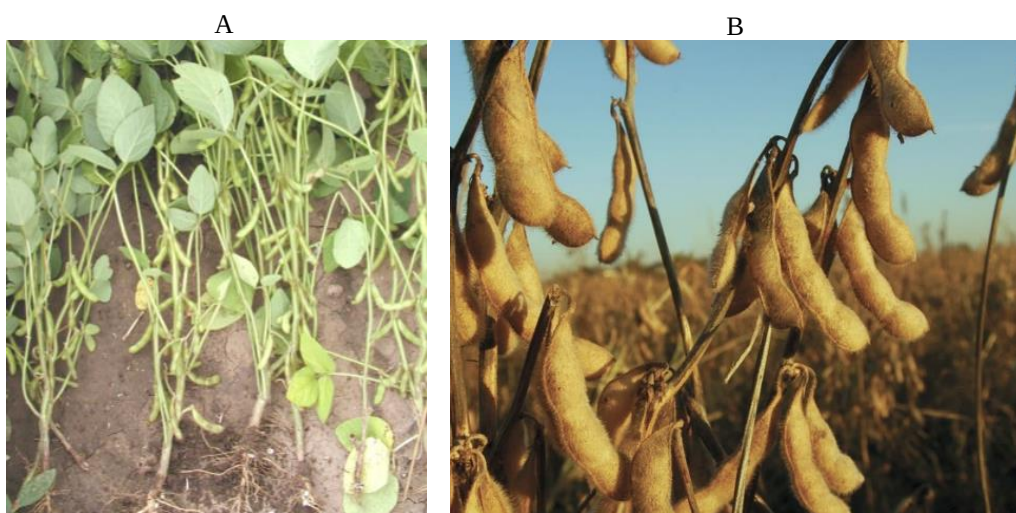
V posledních letech, bylo identifikováno a purifikováno mnoho α -galaktosidas z různých mikrobiálních zdrojů (Ferreira *et al.*, 2011; Comfort *et al.*, 2007; Goulas *et al.*, 2009). Mezi velmi atraktivní enzymy v biotechnologických aplikacích patří zejména extracelulární houbové α -galaktosidasy, pro jejich obecně dobrou stabilitu a vhodné pH optimum (Maheshwari *et al.*, 2000).

Enzymy získané z termofilních organismů jsou často používány v oblasti biotechnologií, protože mohou být purifikovány tepelnou úpravou, uchovávány delší dobu při pokojové teplotě, a vykazují nižší ztráty aktivity při vysokých teplotách, potřebných pro zpracovávání v potravinářském průmyslu. Reakce prováděné při vyšších teplotách, jsou také méně náchylné k mikrobiálním kontaminacím (Maheshwari *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2007).

2.4 Sója jako zdroj sacharidů

Sója luštinatá (*Glycine max*) se řadí do čeledi bobovitých (*Fabaceae*) patří mezi významné luštěniny. Je to jednoletá rostlina dosahující podle odrůdy a růstových podmínek výšky 20-150 cm (viz obrázek 11A) (Minkevič a Borkovskij, 1953). U nás se v teplejších oblastech pěstuje sója žlutosemenná (obrázek 11B).

Sója je původem z Číny, která byla do poloviny minulého století jejím hlavním producentem. Dnes je nejvíce pěstována především v deltě řeky Mississippi v USA (Skorňakov *et al.*, 1991). Plodem jsou lusky, ve kterých se tvoří sójové boby. Namletím se z nich vyrábí sójová mouka jakožto světově nepoužívanější proteinový doplněk krmných směsí. Sójové boby také představují základní surovinu pro průmyslovou výrobu mnoha nápojů a pro výrobu pokrmů bohatých na bílkoviny (Smith a Circle, 1972).



Obrázek 11 – Druhy sóji: A – Sója luštinatá (foto: Rada, V., 2007), B – Sója žlutosemenná (převzato z: <https://www.bungenorthamerica.com/products/categories/15-soybeans>, 2. 5. 2016).

U sóji byly prokázány mnohé pozitivní účinky na zdravotní stav (prevence proti rakovině, srdečním onemocněním v podobě snižování cholesterolu a řídnutí kostí) (Messina *et al.*, 1999). Sójové boby obsahují okolo 33-45 % bílkovin, 30 % sacharidů, 15-25 % tuků a 10 % vody. Největší procentuální zastoupení v sóji má kyselina asparagová a glutamová. Pro nižší obsah esenciálních aminokyselin, především methioninu a cysteinu, není sójová bílkovina plnohodnotná. Po kombinaci s obilovinami lze chybějící aminokyseliny doplnit, a získat tak jejich plnohodnotné spektrum (Smith a Circle, 1972; Dostálová, 2003). Protože sójové boby neobsahují laktosu, je sójové mléko

nízkonákladovou náhražkou mléčných výrobků pro osoby s laktosovou intolerancí (Biranjan *et al.*, 1987).

Sójová mouka se ve velké míře používá také jako zdroj bílkovin v krmných směsích pro zvířata. Nicméně, sójové boby, stejně jako další luštěniny, obsahují vysoké koncentrace rozpustných oligosacharidů, stachyosy a rafinosy, které lidé a monogastriická zvířata nedokážou strávit (Girigowda *et al.*, 2007). Tyto cukry přechází nestrávené do tlustého střeva, kde způsobují nadýmání a gastrointestinální potíže, snižují nutriční hodnotu a celkové vstřebání živin (Ghazi *et al.*, 2003). Nedostatečná hydrolýza oligosacharidů je výsledkem deficitu α -galaktosidasy v lidském zažívacím traktu, což je také hlavním problémem v oblasti využití sójového mléka pro kojeneckou výživu (Biranjan *et al.*, 1987). Většina sóji se spotřebuje na výrobu krmiv pro hospodářská zvířata nebo na průmyslovou výrobu mýdel, barev, laků, syntetických vláken a kaučuku (Dostálová, 2003).

2.4.1 Odstranění antinutričních faktorů ze sóji

Sója obsahuje vysoké množství bílkovin a aminokyselin, ale i navzdory tomu je její nutriční hodnota nízká. Do značné míry je to způsobeno přítomností antinutričních faktorů jako jsou inhibitory proteas (zejména trypsinu), lektiny, fytosteroly, fytoestrogeny a trísloviny. Nejhojněji zastoupené jsou inhibitory proteas, které se odstraňují pomocí tepelného zpracování (Liener, 1994; Osman *et al.*, 2002). Nejpoužívanější metodou je proces zvaný toastování, při kterém se inhibitory proteas tepelně inaktivují horkou vodní parou. Další možností inaktivace je například vaření, pražení, mikrovlnný ohřev a jiné (Velíšek, 1999). Sójové boby obsahují také hemaglutinující isolektiny, což jsou tetramerní glykoproteiny, jejichž přítomnost v potravě snižuje tempo růstu mladých monogastriických zvířat (Van Damme *et al.*, 1997). Existují však případy, kdy jsou inhibitory proteas a lektiny záměrně izolované pro jejich vlastnosti a následné využití v biochemii, molekulární biologii nebo jiné výrobě (Kumar a Gupta, 1994; Duranti *et al.*, 2003, Franco-Fraguas *et al.*, 2003).

Další významnou skupinou antinutričních faktorů jsou nestravitelné oligosacharidy, především rafinosa, verbaskosa a stachyosa (Girigowda *et al.*, 2007). Stravitelnost těchto oligosacharidů se pohybuje kolem 76-88 % u stachyosy, 31-65 % u rafinosy a 32-55 % u verbaskosy. Endogenní enzymy monogastriických živočichů je nedokáží dostatečně trávit. Tyto cukry prochází žaludkem a k jejich fermentaci dochází až v dolní části tenkého

střeva, ve slepém a především v tlustém střevě, kde se vlivem střevní mikroflóry metabolizují na těkavé mastné kyseliny (např. kyselina máselná a octová) (Smiricky *et al.*, 2002).

K odstranění těžko stravitelných oligosacharidů je nutná přítomnost specifických enzymů α -galaktosidas, které jsou produkovány různými mikroorganismy. Jejich deficit vede ke snahám o doplnění tohoto enzymu různými formami. Jednou z nich je i enzymatické ošetření potravin jako je například ošetření sójového mléka α -galaktosidasou a jeho následní využití v dietách pro podvyživené děti či osoby trpícími laktosovou intolerancí (Biranjan *et al.*, 1987). S použitím surového extraktu z *Aspergillus oryzae*, který je známým zdrojem α -galaktosidasy, se podařilo ze sójového mléka odstranit značné množství oligosacharidů (Cruz a Park, 1982).

Příprava α -galaktosidasy je finančně náročná a proto se věnuje velká pozornost snížení výrobních nákladů. Imobilizace α -galaktosidasy na polysacharidech (karagenan, agarosa a alginát) tvořící hydrogely, by mohla vést k vytvoření systému s opětovným použitím. Takto imobilizované enzymy by bylo možné dále použít pro úpravu potravinářských výrobků (Kotiguda *et al.*, 2007, Prashanth *et al.*, 2005, Godbole *et al.*, 1990).

Díky množství sóji, která se každoročně spotřebuje v krmných směsích, by úprava nestravitelných oligosacharidů z této plodiny měla velký pozitivní dopad na ekonomiku a hospodářství v rámci zemědělství.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Mikroorganismy:

Escherichia coli TOP10 (*E. coli* TOP10) – Invitrogen (Carlsbad, USA)

Pichia pastoris X-33 (*P. pastoris* X-33) – Invitrogen (Carlsbad, USA)

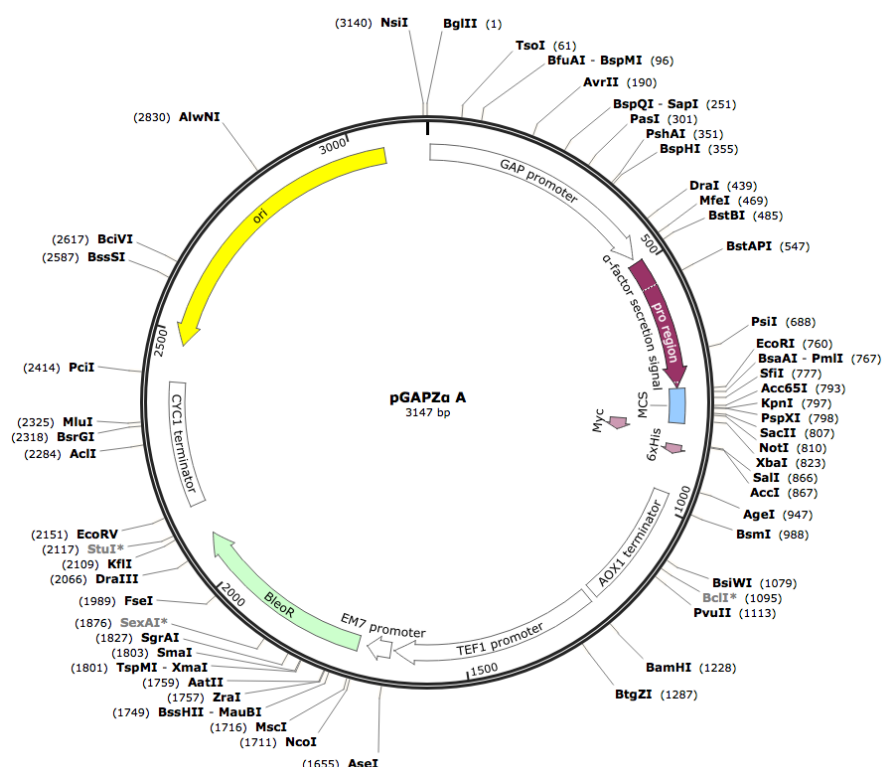
- Použité vektory:

Vektor pGAPZαA – Invitrogen (Carlsbad, USA) (viz obrázek 12)

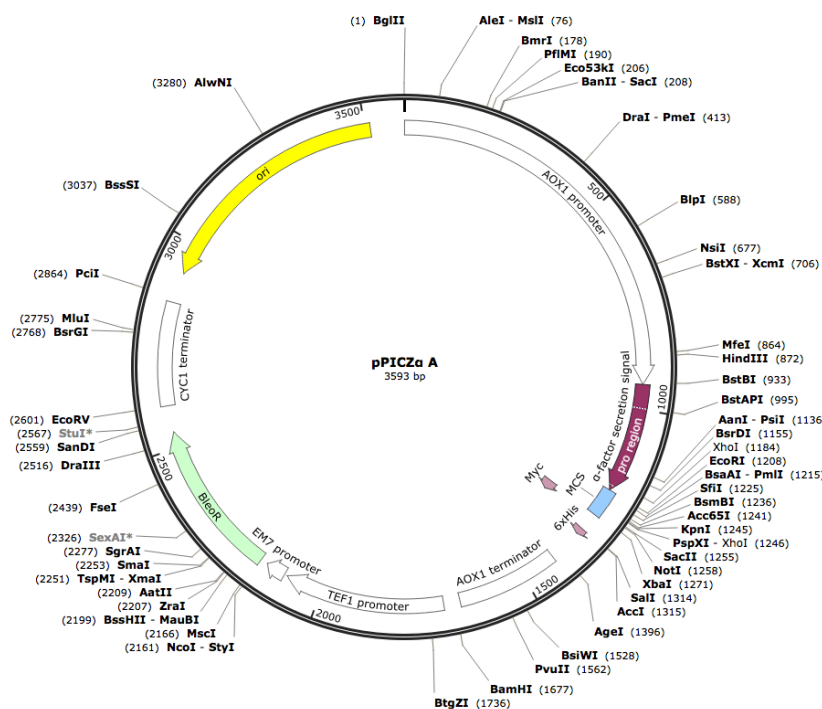
Vektor pPICZαA – Invitrogen (Carlsbad, USA) (viz obrázek 13)

- Gen:

MelA z *Bacillus subtilis* var. *natto* (*B. subtilis* var. *natto*) – Invitrogen (Carlsbad, USA)



Obrázek 12 – Mapa vektoru pGAPZαA (převzato z http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pGAPZ%28alpha%29_A/; 6. 4. 2016)



Obrázek 13 – Mapa vektoru pPICZαA (převzato z https://www.snapgene.com/resources/plasmid/files/yeast_plasmids/pPICZ%28alpha%29_A/; 6. 4. 2016)

3.1.2 Chemikálie

4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosid – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
6x DNA Loading Dye – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Acc65I – NEB (Massachusetts, USA)
Agar – Himedia (Indie)
Agarosa – Qiagen (Hilden, Německo)
Akrylamid – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Amoniumperoxodisulfát (APS) – Fluka (Basel, Švýcarsko)
Asp718I – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
AvrII – Takara (Kyoto, Japonsko)
Biotin – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
CH₃COOH – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Citronan sodný – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Coomassie Brilliant Blue R-250 – Fluka (Basel, Švýcarsko)

CutSmart® pufr – NEB (Massachusetts, USA)
 DreamTaq DNA Polymerasa – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
 Ethanol – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Penta (Chrudim, ČR)
 Fenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
 GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
 Glukosa – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 Glycerol – Penta (Chrudim, ČR)
 Kanamycin – Duchefa (Haarlem, Holansko)
 K_2HPO_4 – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 KH_2PO_4 – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 Kvasničný extrakt – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
 Kvasničný extrakt s obsahem síranu amonného (YNB) – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
 Methanol – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 N, N'-methylenbisakrylamid – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
 NaCl – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 NaOH – Penta (Chrudim, ČR)
 PageRuler Unstained Protein Ladder – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
 Pepton – Fluka (Basel, Švýcarsko)
SacI, *SacII* – NEB (Massachusetts, USA)
 SDS – Lach-Ner (Neratovice, ČR)
 SERVA DNA StainG – BioTech (Praha, ČR)
 Sorbitol – Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
 T4 DNA Ligasa pufr – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
 Tetraethylmethyldiamid (TEMED) – Fermentas (Ontario, Kanada)
 TRIS – Serva (Heidelberg, Německo)
 Trypton – Duchefa (Haarlem, Holansko)
 Zeocin – Duchefa (Haarlem, Holansko)

Komerční kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega (Wisconsin, USA)

3.1.3 Přístroje

Analytické váhy R 200 D – Sartorius (Göttingen, Německo)
Autokláv MLS 3020 – Sanyo (Mnichov, Německo)
Centrifuga Mikro200R – Hettich (Tuttlingen, Německo)
Centrifuga Rotanta 460R – Hettich (Tuttlingen, Německo)
Digestoř 1800/900M – Merci (Brno, ČR)
Elektroforéza Mini-PROTEAN tetra cell – BIO-RAD (Kalifornie, USA)
Elektroporátor ECM 630 – BTX Harvard apparatus (Holliston, USA)
Horizontální elektroforéza ENDURO™ Gel XL – Labnet (New York, USA)
Inkubátor Ecotron – Infors HT (Bottmingen, Švýcarsko)
Image Scanner PowerLook 1120 USG – UMAX (Texas, USA)
Laminární box SCS 2-4 – Faster (Ferrara, Italy)
Laboratorní váhy BWL 51 – Boeco (Hamburg, Německo)
Míchačka magnetická RCT basic – IKA (Staufen, Germany)
Minicentrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N – Biosan (Riga, Lotyšsko)
NanoDrop DS-11 spectrophotometer – DeNovix (Delaware, USA)
pH metr pHenomelna 1100L – VWR (Viedeň, Rakousko)
Pipety research 1000; 200; 20; 2,5 µl – Eppendorf (Hamburg, Německo)
Pipety proline 1000; 200; 20; 2,5 µl – Biohit (Helsinki, Finsko)
Spektrofotometr 8453 UV-VIS – Agilent (Santa Clara, USA)
Termoblok AccuBlock™ digital Dry Baths – Labnet (New York, USA)
Termoblok TS-100C – Biosan (Riga, Lotyšsko)
Třepačka Grant Bio PMR-30 – Grant Instruments (Cambridge, England)
Třepačka MaxQ-4450 – Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
UV transiluminátor GBox – Syngene (Cambridge, UK)
Zdroj MP-300V – Major Science (Saratoga, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava médií, selekčních ploten a zásobních roztoků antibiotik

Příprava všech roztoků a médií byla prováděna v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Zásobní roztoky antibiotik o koncentracích 50 mg/ml a 100 mg/ml byly připraveny rozpuštěním kanamycinu nebo zeocinu v destilované vodě a přefiltrovány pomocí injekční stříkačky přes sterilní 0,2 μ m filtr Ophthalsart.

100 ml Luria-Bertani (LB) agaru bylo připraveno rozpuštěním 0,5 g kvasničného extraktu, 1 g tryptonu a 1 g NaCl v destilované vodě. Přidáním 1M NaOH byla upravena hodnota pH na 7,0 a nakonec bylo přidáno 1,5 g agaru (1,5 % agar). Po sterilizaci v autoklávu a vychlazení na teplotu přibližně 55 °C byl roztok přenesen do laminárního boxu a za sterilních podmínek byl přidán kanamycin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml. Takto připravený roztok byl dále rozlit do plastových Petriho misek a ponechán ke ztuhnutí.

LB médium se sníženým obsahem soli bylo připraveno stejným způsobem, avšak bez přídavku agaru a s polovičním množstvím NaCl. Na přípravu 100 ml bylo tedy použito 0,5 g kvasničného extraktu, 1 g tryptonu, 0,5 g NaCl, pH 7,0.

Pro kultivaci a expresi kvasinek *P. pastoris* X-33 byla použita média YPD (kvasničný extrakt, pepton, glukosa), 2% YPDS agar, YNB (kvasničný extrakt s obsahem síranu amonného), MGY (médium s minimálním obsahem glycerolu), BMG (pufrované médium s minimálním obsahem glycerolu), BMGY (komplexní pufrované médium s glycerolem), MM (médium s minimálním přídavkem methanolu), BMM (pufrované médium s minimálním přídavkem methanolu) a BMMY (komplexní pufrované médium s přídavkem methanolu). Média byla připravena rozpuštěním složek uvedených v tabulce 1 v potřebném množství destilované vody. K úpravě pH byl použit 1M roztok NaOH. Po autoklávování byla podle druhu média přidána sterilní glukosa nebo methanol, biotin a selekční antibiotikum zeocin, jejichž zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním pevných látek v destilované vodě a přefiltrovány injekční stříkačkou přes sterilní 0,2 μ m filtr Ophthalsart.

Tabulka 1 – Složení kultivačních a expresních médií pro kvasinky *P. pastoris* X-33.

Médium	Složení
YPD	1 % kvasničného extraktu, 2 % peptonu, 2 % glukosy, 100 µg/ml zeocin, pH 7,5
YNB	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, 0,5 % glukosy, 100 µg/ml zeocinu
MGY	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, 1 % glycerolu, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu
BMG	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, 1 % glycerolu, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 100 mM KH_2PO_4 pH 6,0
BMGY	1 % kvasničného extraktu, 2 % peptonu, 100 mM KH_2PO_4 pH 6,0; $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, 1 % glycerolu
MM	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 0,5 % methanolu
BMM	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 0,5 % methanolu, 100 mM KH_2PO_4 pH 6,0
BMMY	1 % kvasničného extraktu, 2 % peptonu, 100 mM KH_2PO_4 pH 6,0; $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, 0,5 % methanolu
MM agar	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 0,5 % methanolu, 1,5 % agaru
MD agar	1,34 % kvasničného extraktu s obsahem síranu amonného, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotinu, 2 % dextrosy, 1,5 % agaru
YPDS agar	1 % kvasničného extraktu, 2 % peptonu, 2 % glukosy, 1 M sorbitolu, 100 µg/ml zeocin, pH 7,5, 2 % agaru

3.2.2 Syntéza genu *MelA* z *B. subtilis* var. *natto*

Gen pro α -galactosidasu z *B. subtilis* var. *natto* byl syntetizován specializovanou firmou GeneArt Gene synthesis, Invitrogen (Carlsbad, USA). Samotný *MelA* gen byl navržen tak, aby se na jeho začátku i konci nacházela speciální restriční místa, která usnadní jeho další přenesení do klonovacích a expresních vektorů (viz obrázek 19) (provedeno vedoucím bakalářské práce). Synteticky připravený gen byl dodán ve vektoru *pMK-RQ*, obsahujícím gen pro rezistenci na kanamycin, ve formě lyofilizovaného prášku. 5 µg plazmidu *pMK-RQ::MelA* bylo následně rozpuštěno v 50 µl ultra čisté sterilní vodě.

3.2.3 Transformace plazmidu *pMK-RQ::Mela* do *E. coli* TOP10 pomocí tepelného šoku

K 50 μ l chemokompetentních bakterií *E. coli* TOP10 bylo přidáno 5 μ l plazmidové DNA *pMK-RQ::Mela*. Po 15 min na ledě, byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku na 1 min vložení do předem vyhřátého termobloku na 42 °C, a poté ihned umístěny na led na další 3 min. Pro regeneraci bylo k transformovaným buňkám přidáno 250 μ l SOC média (2 % trypton; 0,5 % kvasničný extrakt; 0,05 % NaCl; 2,5mM KCl; 9,95mM MgCl₂; 20mM glukosa). Vzorky byly následně přeneseny na třepačku a inkubovány 1 h při 37 °C.

Transformované bakterie byly na závěr vysety na agarové plotny s LB médiem obsahujícím kanamycin o koncentraci 50 μ g/ml a inkubovány při teplotě 37 °C do následujícího dne.

3.2.4 Inokulace *E. coli* TOP10

Veškerá práce s kulturami probíhala v přísně sterilních podmínkách v laminárním boxu. Vybrané kolonie *E. coli* TOP10 transformované plazmidem *pMK-RQ::Mela* byly vypíchnuty sterilním párátkem a přeneseny do zkumavek s LB médiem s obsahem kanamycinu o koncentraci 50 μ g/ml.

Obdobně bylo ze zásobní kultury *E. coli* TOP10 pPICZ α A a *E. coli* TOP10 pGAPZ α A připraveno inokulum ve 2 ml LB média s nízkým obsahem solí a zeocinu o koncentraci 50 μ g/ml.

Všechny kultury byly inkubovány přes noc v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 160 rpm.

3.2.5 Izolace plazmidové DNA

Bakteriální kultury *E. coli*, inkubované přes noc, byly přeneseny do 2ml mikrozkuvek a centrifugovány 5 min při 5 000 g a 4 °C.

Supernatant byl odlit a pelet byl rozsuspendován v 0,3 ml roztoku P1 (10mM Na₂EDTA; 50mM Tris/HCl; 0,1 mg/ml RNAasy; pH 8,0). Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 (1% SDS; 0,2M NaOH) a zkumavky byly 4x promíchány převrácením v ruce a ponechány 5 min při pokojové teplotě. Po přidání roztoku P3 (3M KCH₂COOH, pH 5,5) byla suspenze v mikrozkuvkách 4x promíchána převrácením v ruce a inkubována 5 min na ledě (zabránění opětovnému rozpouštění vysrážených proteinů).

Poté následovala centrifugace 10 min při 10 000 g a 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek, kde k němu bylo přidáno 0,6 ml isopropanolu. Obsah v mikrozkušavkách byl promíchán převrácením v ruce proti světlu do vzniku homogenní směsi a centrifugován 10 min při 14 000 g a 4 °C. Supernatant byl odlit a sraženina DNA byla promyta 0,5 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Po 5 min centrifugace při 14 000 g a 4 °C byl supernatant opět odlit, mikrozkušavky byly krátce stočeny a zbytky ethanolu odpipetovány. Vyizolovaná sraženina DNA byla ponechána k sušení na 10-15 min v laminárním boxu a poté rozpuštěna v 50 µl ultra čisté sterilní vody.

3.2.6 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop DeNovix DS-11. Přístroj byl nastaven na mód dsDNA a vynulován na 2 µl ultra čisté vody. Poté byly na styčnou plochu nanесeny 2 µl ultra čisté vody a přeměřeny (kontrola správnosti). Následně byla změřena absorbance vzorku v 1,5-2 µl při vlnových délkách 260 a 280 nm, ze kterých byla finálně určena koncentrace a čistota vyizolované DNA.

3.2.7 Restrikce plazmidové DNA

Endonukleasy *Asp718I* / *Acc65I* (rozpoznávají stejné restrikční místo) a *SacII* specificky rozeznávají krátké úseky dvouvláknové DNA a následně je štěpí za vzniku lepivých konců (viz obrázek 14 a 15). Tyto enzymy byly použity k restrikci plasmidu *pMK-RQ::MelA* a vektorů *pPICZαA* a *pGAPZαA* pro následné vložení genu *MelA*.



Obrázek 14 – Restrikční místo endonukleasy *Asp718I* (*Acc65I*)



Obrázek 15 – Restrikční místo endonukleasy *SacII*.

Restrikční reakce byla připravena smícháním reagensů podle tabulky 2, probíhala 1 h při 37 °C, přičemž množství plazmidové DNA v reakci bylo přibližně 1000 ng. Reakce byla zastavena 20 min inkubací při 65 °C (inaktivace endonukleas). Restrikční produkty byly následně analyzovány pomocí agarosové elektroforézy.

Tabulka 2 – Nastavení restrikční reakce

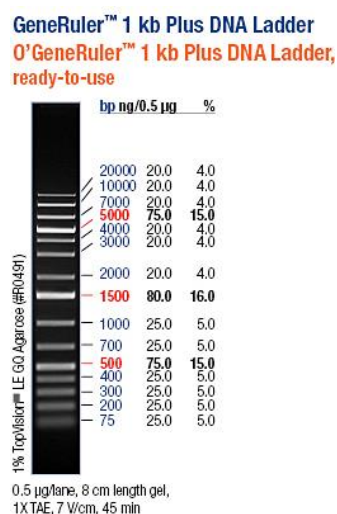
	pPICZaA	pGAPZaA	pMK-RQ::Mela
Plazmidová DNA	7,0 µl	7,0 µl	10 µl
Ultra čistá voda	10,6 µl	10,6 µl	7,6 µl
10x CutSmart pufr	2,0 µl		
<i>Asp</i> 718I	0,2 µl		
<i>Sac</i> II	0,2 µl		
Celkový objem	20 µl		

3.2.8 Agarosová elektroforéza

V mikrovlnné troubě byla rozpuštěna agarosa (1%) v 50 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (40mM Tris/acetát, 1mM EDTA, pH 8,0). K roztoku bylo přimícháno 1,5 µl barviva SERVA DNA Stain G a obsah byl vlit do horizontální elektroforetické komůrky, kde po zasazení hřebínku tuhnul přibližně 30 minut. Poté byl hřebínek vyjmut, komůrka byla vložena do elektroforetické cely a přelita 1x TAE pufrem tak, aby byl připravený gel zcela ponořen pod hladinou pufru.

Vzorky byly připraveny smícháním 5-20 µl vyizolované plazmidové DNA s 1-4 µl nanášecího pufru 6x DNA Loading Dye (poměr 1:5). Do jamek v gelu byly nanесeny jednotlivé vzorky a 5 µl standardu GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (viz obrázek 16). Na celu bylo přiloženo víko a připojeno ke zdroji elektrického napětí, který byl nastaven na 100 V po dobu 30 min.

Po elektroforetickém rozdělení DNA fragmentů byla jejich pozice vizualizována pomocí UV transiluminátoru a výstupní snímek byl uložen.



Obrázek 16 – GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder: Standard molekulové hmotnosti DNA (převzato z: <http://eshop.biogen.cz/ogeneruler-1-kb-plus-dna-ladder-ready-to-use>; 22. 4. 2016).

3.2.9 Izolace DNA z agarosového gelu

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit). Pásky odpovídající produktům restrikce byly vyřezány z gelu skalpelem, vloženy do mikrozkušavky a zváženy na analytických vahách. Na 10 mg gelu bylo přidáno 10 µl membránu vazebného roztoku. Směs byla zvortexována a inkubována při 60 °C dokud se gel zcela nerozpustil.

Rozpuštěný směs byla přenesena do filtrační mikrozkušavky a 1 min ponechána při pokojové teplotě. Poté byla zkumavka centrifugována 1 min při 14 000 g. Supernatant byl odlit, následně bylo přidáno 700 µl membránu promývacího roztoku a znovu stočeno 5 min při 14 000 g. Supernatant byl odpipetován a celý proces opakován ještě jednou s 500 µl membránu promývacího roztoku.

Poté byl filtr přenesen do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Pro eluci navázané DNA bylo přidáno 30 µl ultra čisté vody. Po 1 min byly zkumavky přeneseny do centrifugy a stočeny 1 min při 14 000 g. Filtr byl vyjmut a pomocí NanoDropu byla stanovena koncentrace izolované DNA.

3.2.10 Ligace

Po restrikci byl do plazmidů pPICZαA a pGAPZαA zaligován gen pro MelA pomocí T4 DNA ligasy, která katalyzuje tvorbu fosfodiesterových vazeb v dvouvláknové DNA mezi sousedními 3'-hydroxylovými a 5'-fosfátovými konci (Rossi *et al.*, 1997).

Do ligační směsi byly napipetovány reagenty uvedené v tabulce 3. Objemy byly spočítány tak, aby v jedné reakci bylo 50 ng plazmidové DNA a 150 ng genu MelA. Insert byl tak oproti vektoru v nadbytku v poměru 3:1. Ligace probíhala 1 h při 22 °C. T4 DNA ligasa byla následně inaktivována inkubací 10 min při 65 °C.

Tabulka 3 – Složení ligačních směsí

	µl
pPICZαA (13,2 ng/µl)	3,8
Gen MelA (13,7 ng/µl)	11,0
T4 DNA Ligasa (5 U/µl)	0,2
10x T4 DNA Ligase buffer	2,0
Ultra čistá voda	3,0
Celkový objem	20,0

	µl
pGAPZαA (13,7 ng/µl)	3,7
Gen MelA (13,7 ng/µl)	11,0
T4 DNA Ligasa (5 U/µl)	0,2
10x T4 DNA Ligase buffer	2,0
Ultra čistá voda	3,1
Celkový objem	20,0

Ligační směs byla transformována do *E.coli* TOP10 pro pomnožení plasmidů, následně bylo připravené inokulum a izolována plazmidová DNA (viz kapitoly 3.2.3-3.2.8).

3.2.11 Sekvencování

Připravené konstrukty *pGAPZαA::Mela* a *pPICZαA::Mela* byly izolovány z kultur *E. coli* TOP10. Vzorky na sekvencování byly připraveny v 1,5ml mikrozkuhavce smícháním 500 ng plazmidové DNA s 5 μl 5 μM roztoku primeru. Pro plazmid *pPICZαA::Mela* byly použity primery pPICZαAfw a pPICZαArev, a pro plazmid *pGAPZαA::Mela* byly použity primery pGAPZαAfw a pPICZαArev (stejný reverse primer pro oba plazmidy) (viz tabulka 4). Vzorky byly patřičně popsány (název a číslo vzorku) a po vyplnění elektronické objednávky na internetové adrese www.seqme.cz byly vzorky zaslány do specializované firmy SEQme s.r.o. (Dobříš, ČR), kde byla osekvencováním ověřena správnost nukleotidové sekvence genu *Mela*.

Tabulka 4 – Složení vzorku připraveného pro sekvencování.

	μl
Templátová DNA (<i>pGAPZαA::Mela</i> nebo <i>pPICZαA::Mela</i>)	5,0
Příslušný primer (pGAPZαAfw, pPICZαArev nebo pPICZαAfw)	5,0
Celkový objem	10,0

3.2.12 Příprava elektrokompetentních kvasinek *P. pastoris* X-33

Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna ve sterilním prostředí laminárního boxu. Kvasinková kultura *P. pastoris* X-33 byla inokulována do 3 ml YPD média a kultivována přes noc při 30 °C a 250 rpm. Další den bylo přeneseno potřebné množství kultury do 50 ml YPD média tak, aby výsledná hodnota OD₆₀₀ byla 0,005. Kultura byla kultivována při 30 °C a 250 rpm do dosažení optické hustoty 1. Následovala centrifugace ve vychlazené centrifugační kyvetě 5 min při 3 000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet byl opatrně resuspendován v 50 ml ledově vychlazené sterilní destilované vody a centrifugován ve vychlazené centrifugační kyvetě 5 min při 3 000 rpm a 4 °C. Tento krok byl zopakován ještě jednou. Pelet byl poté promyt 50 ml ledově vychlazeného sterilního 1M sorbitolu a opět zcentrifugován. Na závěr byl pelet resuspendován v 1 ml ledově

vychlazeném sterilním 1M sorbitolu, naředěn na $OD_{600} = 200$ 15% glycerolem, rozpipetován po 80 μ l do 1,5ml mikrozkušavek a zamražen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.13 Linearizace

Pro vnesení plazmidu do kvasinkového expresního systému *P. pastoris* X-33 je nezbytná jeho linearizace. Plazmid *pPICZaA::Mela* byl proto linearizován restričním enzymem *SacI* a plazmid *pGAPZaA::Mela* restričním enzymem *AvrII*.

K 15 μ l izolované plazmidové DNA o přibližné finální koncentraci 150 μ g byly přidány reagenty podle tabulky 5 a reakce byla inkubována přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 5 – Reagenty pro linearizaci plazmidů *pPICZaA::Mela* a *pGAPZaA::Mela*

	μ l		μ l
<i>pPICZaA::Mela</i> (9285,4 ng/ μ l)	15	<i>pGAPZaA::Mela</i> (10180 ng/ μ l)	15
<i>SacI</i> (10 U/ μ l)	1	<i>AvrII</i> (10 U/ μ l)	1
10x Cutsmart pufr	5	10x Cutsmart pufr	5
Ultra čistá voda	29	Ultra čistá voda	29
Celkový objem	50	Celkový objem	50

3.2.14 Přečištění linearizovaných konstruktů

Linearizovaná plazmidová DNA byla zbavena nečistot fenol-chloroformovou extrakcí. Ke vzorku byl přidán stejný objem směsi fenol-chloroform-isoamylalkoholu v objemovém poměru 25:24:1, směs byla zvortexována a zcentrifugována 5 min při 14 000 g. Vodná fáze byla odebrána do nových mikrozkušavek, kde k ní bylo přidáno 2,5 násobku objemu 100% ethanolu a 1/10 objemu 3M octanu sodného. Směs byla zvortexována a následně centrifugována 30 min při 14 000 g. Supernatant byl znovu odpipetován a pelet byl promyt 500 μ l 70% ethanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla směs centrifugována 10 min při 14 000 g. Pelet byl zbaven supernatantu, ponechán 10-15 min sušit v laminárním boxu a na závěr byl rozpuštěn v adekvátním množství ultra čisté sterilní vody. Koncentrace byla stanovena pomocí NanoDropu.

3.2.15 Elektroporace kvasinek *P. pastoris* X-33

Do vychlazených elektroporačních kyvet bylo napipetováno 80 μ l elektrokompetentních kvasinek *P. pastoris* X-33 a 1 μ l přečištěné linearizované plazmidové DNA *pPICZaA::Mela* o koncentraci 3,1 μ g/ μ l nebo *pGAPZaA::Mela* o koncentraci 2,5 μ g/ μ l.

Vzorky stály 5 minut na ledě, poté byly postupně vloženy do elektroporační cely a vystaveny elektrickému výboji 1 500 V po dobu 5 ms. Po elektroporaci byl přidán 1 ml sterilního ledového 1M sorbitolu a celý vzorek byl přenesen do 1,5ml mikrokumavek.

Vzorky byly následně inkubovány 1 h při 30 °C a rozetřeny na YPDS selekční agarové plotny s obsahem zeocinu 100 µg/ml, které byly kultivovány ve tmě při 30 °C.

Vybrané kolonie byly následně vypíchnuty sterilním párátkem a inokulovány do 3 ml YPD média s obsahem zeocinu o koncentraci 100 µg/ml. Kultivace probíhala v orbitálním inkubátoru bez přístupu světla do druhého dne při 250 rpm a 30 °C.

3.2.16 Polymerázová řetězová reakce kolonií (Colony PCR)

Pro ověření pozitivních transformantů byly kolonie *P. pastoris* X-33 transformované *pPICZαA::Mela* nebo *pGAPZαA::Mela* analyzovány polymerázovou řetězovou reakcí. Kolonie byla suspendována v destilované vodě, denaturována 5 min při 95°C a poté použita jako templát DNA pro PCR reakci. Pro *pPICZαA::Mela* byl použit forward primer PICZfw a revers primer PICZrev. Pro *pGAPZαA::Mela* byl použit forward primer GAPZfw a revers primer PICZrev, který byl společný pro oba vektory (viz tabulka 6). Jako negativní kontrola byla použita netransformovaná kultura *P. pastoris* X-33 a jako pozitivní kontrola vyizolované plazmidy *pPICZαA::Mela* nebo *pGAPZαA::Mela*. Výsledky byly vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 6 – Sekvence použitých primerů (primer pPICαArev byl použit pro oba plazmidy).

Primer	Sekvence 5' → 3'
pPICZαAfw	TTT TTA CGA CTT TTA ACG A
pGAPZαAfw	CTA CTA TTG CCA GCA TTG
pPICαArev	TCA ATG ATG ATG ATG ATG A

Tabulka 7 – Složení PCR směsi

	μl
Templátová DNA	5,0
Ultra čistá voda	3,9
10x Green pufr	4,0
25mM MgCl ₂	2,5
10mM dNTPs	0,4
5μM forward primer	2,0
5μM reverse primer	2,0
GoTaq polymerasa	0,2
Celkový objem	20,0

Podmínky pro reakci PCR:

1. Počáteční denaturace 95°C / 2 min
2. Denaturace 95 °C / 1 min
3. Nasedání primerů 58 °C / 1 min pro *pPICZαA::Mela*
60 °C / 1 min pro *pGAPZαA::Mela*
4. Elongace 72°C / 2 min
Cykly 2-4 se 30x opakovaly
5. Závěrečná elongace 72 °C / 2 min
6. Konec: 4 °C, ∞.

3.2.17 Stanovení fenotypů Mut⁺ a Mut^S u kvasinek *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela*

Pro správnou expresi proteinu je vyžadováno, aby *P. pastoris* X-33 odpovídaly fenotypu Mut⁺. Rozlišení fenotypů Mut⁺ a Mut^S bylo provedeno vypíchnutím vybraných kolonií *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* a jejich kultivací na selekčních agarových plotnách s MD (médium s minimálním přídatkem glukosy) a MM (médium s minimálním přídatkem methanolu) mediem při 30 °C. Pozice kolonií byla zaznamenána a narostlé kolonie byly později vyhodnoceny.

3.2.18 Optimalizace exprese genu *Mela* v *P. pastoris* X-33

Expresní systém kvasinek *P. pastoris* X-33 umožňuje na rozdíl od bakterií postranlační úpravy proteinů. Plazmid pGAPZαA obsahuje promotor P_{GAP}, který umožňuje konstitutivní expresi genů, což znamená, že gen *Mela* je neustále v malém

množství přepisován, a v buňce se udržuje jeho stálá hladina, kdežto vektor *pPICZαA* exprimuje inducibilně. To znamená, že se exprese snižuje nebo zvyšuje v závislosti na přidavku indukčního činidla (v našem případě přidavkem methanolu na celkový objem 0,5 %).

Ze zamražené kultury *P. pastoris* X-33 *pGAPZαA::Mela* byly sterilním párátkem inokulovány zkumavky s 2 ml YPD a YNB média s obsahem zeocinu o koncentraci 100 µg/ml. Kultury byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 250 rpm a 30 °C. Další den byla u kultur pomocí spektrofotometru stanovena hodnota OD₆₀₀ a bylo spočítáno množství vzorku, které bylo přidáno k 50 ml YPD nebo YNB média tak, aby v nich byla optická hustota rovna 1. Kultury byly přeneseny zpět do orbitálního inkubátoru a kultivovány při 250 rpm a 30 °C. V časových intervalech 0, 1, 2, 3, 4 a 7 dnů byly odebrány 2 ml vzorku, centrifugovány 10 min při 6 500 g, supernatant byl odpipetován do nových mikrozkuvek a uchováván při -20 °C.

Kvasinky *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* fenotypu Mut⁺ byly inokulovány do 2 ml MM, BMM a BMMY média. Kultury byly dále inkubovány v orbitálním inkubátoru při 250 rpm a 30 °C. Následující den byla u kultur pomocí spektrofotometru stanovena hodnota OD₆₀₀ a bylo spočítané množství vzorku, které bylo přidáno k 50 ml MM, BMM a BMMY média tak, aby v novém médiu bylo OD₆₀₀ = 1. Kultury byly přeneseny zpět do orbitálního inkubátoru a kultivovány při 250 rpm a 30 °C. V časových intervalech 0, 1, 2, 3, 4 a 7 dnů byl přidán 100% methanol na celkový objem 0,5 % pro vyvolání indukce a zároveň byly odebrány 2 ml vzorku. Následovala centrifugace 10 min při 6 500 g, supernatant byl odpipetován do nových mikrozkuvek a uchováván při -20 °C.

Pro pozitivní kontrolu byla do dvou zkumavek po 2 ml LB média inokulována kultura *B. subtilis* var. *natto* a kultivována do dalšího dne při 37 °C a 160 rpm. Jeden vzorek byl ponechán v podobě buněčné suspenze, druhý vzorek byl centrifugován 10 min při 6 500 g a supernatant byl odpipetován do nové mikrozkuvky.

Pro analýzu buněčných peletů byly získané pelety buněk *P. pastoris* X-33 *pGAPZαA::Mela* rozsuspendovány v 1 ml pufru (300mM NaCl, 50mM Na₂HPO₄, 5% glycerol, pH 8,0) a zamraženy v tekutém dusíku. Poté byly vloženy do předem vyhrátého termobloku na 42 °C. Tento postup byl zopakován 10x. Nakonec byly zcentrifugovány 30 min při 14 000 g, 4 °C a supernatant byl přenesen do nových mikrozkuvek.

Expres α -galaktosidasy byla ze vzorků *P. pastoris* X-33 *pGAPZ α A::Mela* analyzována pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 3.2.19) a ze vzorků *P. pastoris* X-33 *pPICZ α A::Mela* analyzována pomocí spektrofotometrického měření aktivity (viz kapitola 3.2.21).

3.2.19 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

Skla pro přípravu SDS-PAGE gelů byly vloženy do stojanu a mezi ně byl nalit roztok dělicího gelu, který byl připraven smícháním reagensů z tabulky 8. Poté byla hladina gelu převrstvena několika kapkami n-butanolu. Přibližně po 30 min dělicí gel ztuhl, n-butanol byl odlit, zbytky byly vysušeny savým papírem a na dělicí gel byl nalit zaostřovací gel (Viz tabulka 8). Pro vytvoření jamek pro vzorky byl do vznikajícího gelu vložen hřebínek. Po ztuhnutí gelu byla sklíčka přemístěna do elektroforetické vaničky a zalita 750 ml 1x koncentrovaného dělicího pufru (50 mM Tris-HCl, 384 mM glycin, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, pH 8,3).

Vzorky byly připraveny smícháním 20 μ l supernatantu z buněčné suspenze s 4 μ l 6x koncentrovaného nanášecího pufru (0,05 mol/l Tris/HCl, 2 mmol/l EDTA, 2% SDS, 10% glycerol, 0,2% bromfenolová modř, 6% merkaptoethanol, pH 6,8). Následně byly vzorky denaturovány 5 min v termobloku při 99 °C. Do vzniklých jamek po vytažení hřebínku bylo nanášeno 20 μ l vzorku a do jedné jamky bylo vždy nanášeno 5 μ l standardu PageRuler unstained protein ladder.

Vanička byla přikryta víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí, které bylo nastaveno na 100 V. Po zakoncentrování vzorků bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforetická separace byla ukončena po doputování bromfenolové modři na konec gelu, což trvalo přibližně 90 min.

Tabulka 8 – Složení gelu pro SDS-PAGE (příprava 1 gelu)

ml	10% Dělicí gel
3,63	destilovaná voda
2,5	30% akrylamidový roztok (29,2 % akrylamidu, 0,8 % N,N-bis-methylen-akrylamidu)
1,25	dělicí pufr (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
0,075	10% SDS
0,375	10% persíran amonný
0,0075	TEMED

ml	4% Zaostřovací gel
2,565	destilovaná voda
0,5	30% akrylamidový roztok (29,2 % akrylamidu, 0,8 % N,N-bis-methylen-akrylamidu)
0,625	zaostřovací pufr (1 M Tris-HCl, pH 6,8)
0,375	10% SDS
0,025	10% persíran amonný
0,005	TEMED

3.2.20 Barvení gelu s Coomassie Brilliant Blue

Pro vizualizaci výsledků z SDS-PAGE byly gely barveny 30 min v barvicím roztoku (0,025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová). Poté byly gely promyty destilovanou vodou a minimálně 15 min promývány odbarvovacím roztokem (40% methanol, 10% kyselina octová, destilovaná voda). Na závěr byly gely uskladněny v destilované vodě. Pomocí scanneru (Image Scanner PowerLook 1120 USG, AP Czech, ČR) byly gely oskenovány a výsledný obraz byl uložen.

3.2.21 Měření aktivity α -galaktosidasy

Aktivita byla měřena přímo na základě katalytické reakce α -galaktosidasy se substrátem 4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosidem. Absorbance vzniklého produktu 4-nitrofenolu byla detekována pomocí spektrofotometru při 410 nm a výsledky byly zaznamenány do grafů.

Roztoky 2M Na₂CO₃, 20mM 4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosid a 50mM citronanu sodného byly připraveny rozpuštěním látek v destilované vodě. pH citronanu sodného bylo upraveno na 4,5 pomocí CH₃COOH. 4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosid byl uchováván při -20 °C.

Enzymatická reakce byla zahájena smícháním reagensů podle tabulky 9, následně byla zvortexována a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Přidáním 750 μ l 2M Na₂CO₃ byla reakce zastavena. Spektrofotometr byl vynulován směsí 250 μ l 50mM citronanu

sodného pH 4,5 s 750 µl 2M Na₂CO₃. Následně byly proměřeny vzorky enzymatického roztoku z dnů 0-7 od začátku exprese, a také vzorky pozitivní kontroly z *B. subtilis* var. *natto* (odběr vzorků viz kapitola 3.2.18).

Tabulka 9 – Složení enzymatické reakce pro měření aktivity α -galaktosidasy.

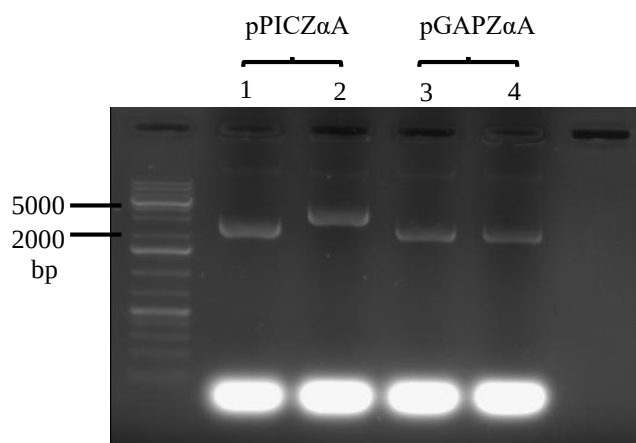
	Reagencie	µl
1	20mM 4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosid	12,5
2	50mM citronan sodný pH 4,5	187,5
3	Enzymatický roztok z expresního média	50,0
4	2M Na ₂ CO ₃	750,0
	Celkový objem reakce	1000,0

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro expresi α -galaktosidasy z genu *MelA* v *P. pastoris* X-33 byly připraveny dva konstrukty skládající se z vektoru pPICZ α A / pGAPZ α A a sekvence kódující gen *MelA*. Pomocí restrikčních endonukleas *Asp*718I a *Sac*II byl gen *MelA* vyštěpen z *pMK-RQ::MelA* a vložen do těchto expresních vektorů.

4.1 Příprava konstruktů *pPICZ α A::MelA* a *pGAPZ α A::MelA*

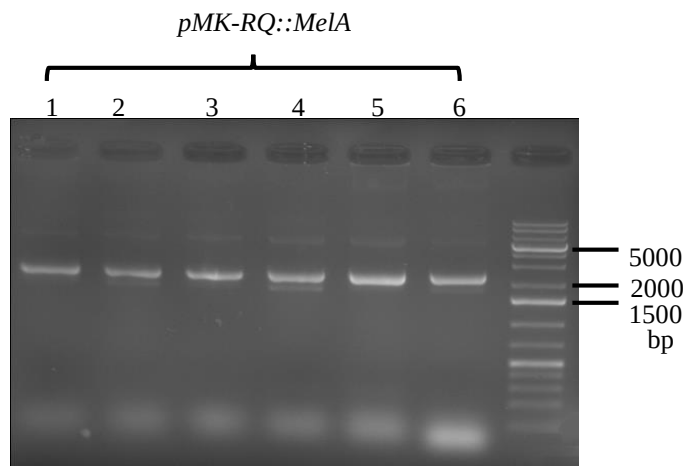
Ze zásobních kultur *E. coli* TOP10 s plazmidem pPICZ α A a pGAPZ α A, kultivovaných v LB médiu s nízkým obsahem solí, byla izolována plazmidová DNA. Pro ověření přítomnosti plazmidů byla DNA následně podrobena elektroforetické separaci na agarosovém gelu. Podle manuálu výrobce má plazmid pPICZ α A velikost 3593 bp a plazmid pGAPZ α A 3147 bp. Na gelu byly detekovány produkty o velikosti 2000 až 3000 bp, což odpovídá plazmidům v jejich cirkulární formě, zároveň zde byly slabě viditelné pásy nad hranicí 5000 bp, které pravděpodobně vznikly spojením více kopií plazmidu (viz obrázek 17).



Obrázek 17 – Izolované vektory pPICZ α A a pGAPZ α A z *E. coli* TOP10.

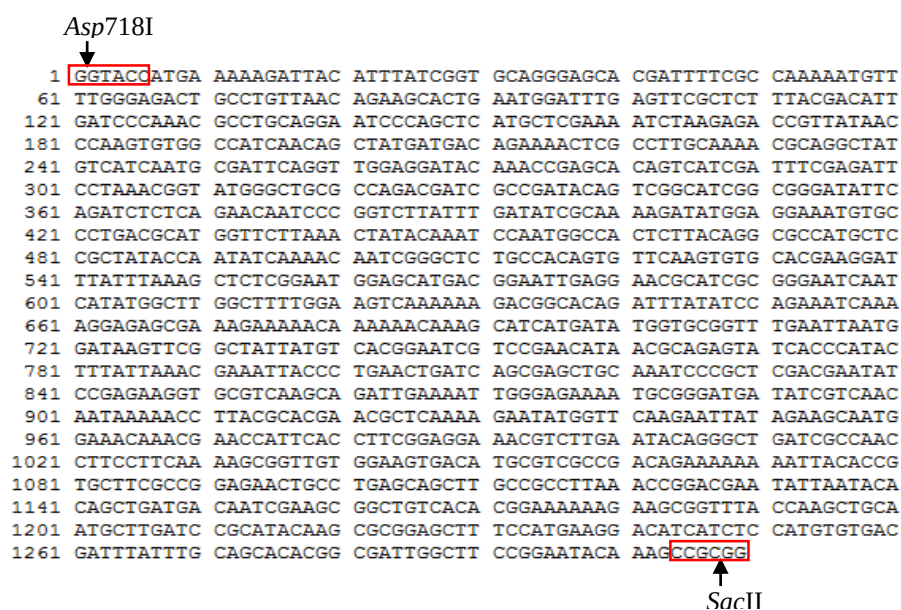
Pro pomnožení synteticky připraveného plasmidu byla provedena transformace plasmidu *pMK-RQ::MelA* do *E. coli* TOP10. Selekcce transformantů proběhla na LB agarových plotnách s kanamycinem, kde narostlo nespočetně mnoho kolonií. Z vybraných transformovaných buněk byla izolována plazmidová DNA (*pMK-RQ::MelA*). Výsledky izolace byly vizualizované pomocí agarosové elektroforézy, kde pásy odpovídající cirkulární formě plasmidu byly detekované v rozmezí 2000 až 3000 bp (viz obrázek 18). Také byl pozorován i druhý pás o přibližné velikosti 5000 bp, což je způsobeno

přítomností agregované formy (spojení více kopií plazmidu). Reálná velikost plazmidu *pMK-RQ::Mela* je 3587 bp. Tímto byla ověřena přítomnost plazmidů ve vzorcích a pro další práci byly vybrány kultury *E. coli* TOP10 *pPICZαA* číslo 1, *E. coli* TOP10 *pGAPZαA* číslo 4 a *E. coli* TOP10 *pMK-RQ::Mela* číslo 5.



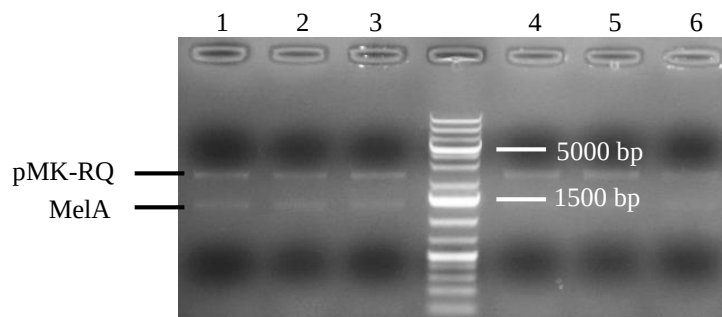
Obrázek 18 – Izolovaná plazmidová DNA *pMK-RQ::Mela* z různých klonů *E. coli* TOP10.

Izolované vektory *pPICZαA* a *pGAPZαA* a plasmid *pMK-RQ::Mela* byly následně podrobeny restrikci použitím specifických endonukleas *Asp718I* a *SacII*, kterých reštrikční místa se nacházejí v klonovací kazetě obou vektorů a byly také navrhnutá v synteticky připravenem genu *Mela* (viz obrázek 19). Výsledky restrikce byly poté vizualizované pomocí agarosové elektroforézy.



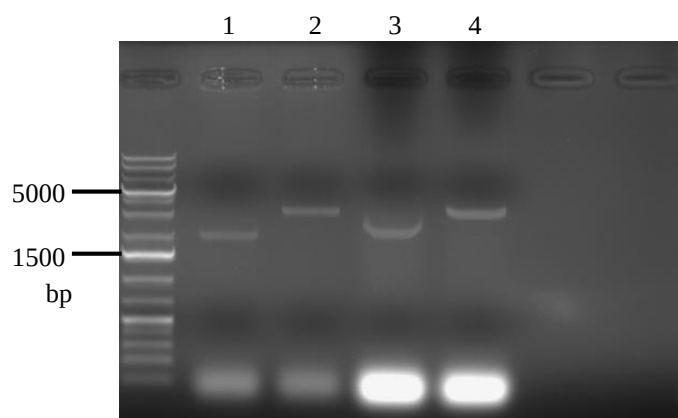
Obrázek 19 – Sekvence genu *Mela* s vyznačenými restrikčními sekvencemi a štěpnými místy pro endonukleasy *Asp718I* a *SacII*.

Po restrikci vektoru *pMK-RQ::Mela* (3587 bp) bylo možné na agarosovém gelu pozorovat dva relativně slabě viditelné produkty. Spodní pás o velikosti kolem 1400 bp odpovídal genu *MelA* o reálné velikosti 1299 bp a vrchní pás o přibližné velikosti 2500 bp odpovídal zbytku vektoru *pMK-RQ* (reálná velikost 2288 bp) (obrázek 20).



Obrázek 20 – Produkty restrikční analýzy vektoru *pMK-RQ::Mela* za použití enzymů *Asp718I* a *SacII*.

Na druhý gel (obrázek 21) byly naneseny vzorky do čtyř jamek. Do jamky 1 byl pro kontrolu přidán prázdný nenaštipaný vektor *pGAPZαA*. Do jamky 2 byl přidán vektor *pGAPZαA* poštěpený endonukleasami *Asp718I* a *SacII*. V jamce 3 byl jako kontrola nanesen prázdný nenaštipaný vektor *pPICZαA* a v jamce 4 byl *pPICZαA* poštěpený endonukleasami *Asp718I* a *SacII*. Velikost pásů u kontrolních cirkulárních vektorů se pohybovala v rozmezí 2000 až 3000 bp. Linearizované vektory *pGAPZαA* (jamka 2) a *pPICZαA* (jamka 4) dosahovaly na gelu velikosti přibližně 3000 bp. Těmito pokusy bylo ověřeno správné štěpení endonukleas *Asp718I* a *SacII*.

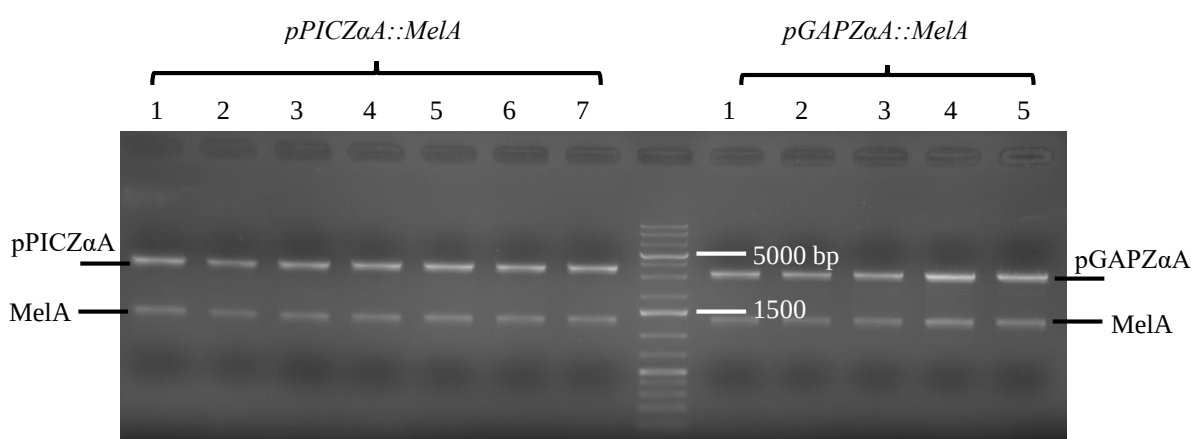


Obrázek 21 – Restrikce vektorů *pGAPZαA* a *pPICZαA* za použití enzymů *Asp718I* a *SacII*. 1 – cirkulární vektor *pGAPZαA*, 2 – poštěpený vektor *pGAPZαA*, 3 – cirkulární vektor *pPICZαA*, 4 – poštěpený vektor *pPICZαA*.

Z gelu, na kterém byla vizualizována restrikce *pMK-RQ::Mela* (obrázek 20) a restrikce vektorů *pGAPZαA*, *pPICZαA* (obrázek 21), byly skalpelem vyřezány pásy odpovídající genu *Mela* z jamek 3 a 4 o přibližné velikosti 1400 bp a pásy poštěpených vektorů *pGAPZαA*, *pPICZαA* z jamek 2 a 4 o přibližné velikosti 3000 bp. Následným přečištěním pomocí Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systém – kitu (viz kapitola 3.2.9) bylo získáno 30 µl DNA o koncentracích 13,7 ng/µl (*Mela* 3); 12,2 ng/µl (*Mela* 4); 13,2 ng/µl (*pPICZαA* 4); 13,7 ng/µl (*pGAPZαA* 2).

DNA izolovaná z gelu byla následně podrobena ligační reakci, kdy gen *Mela* byl pomocí T4 DNA ligasy vnesen do poštěpených vektorů *pPICZαA* a *pGAPZαA*. Takto připravené konstrukty *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 pro jejích pomnožení. Kultivace proběhla na LB agarových plotnách s nízkým obsahem solí, pod selekčním tlakem zeocinu (vektory *pPICZαA* a *pGAPZαA* obsahují gen rezistence vůči tomuto antibiotiku). Na plotnách vyrostlo několik desítek kolonií, které byly následně inokulovány do tekutého LB média s nízkým obsahem solí.

Pro kontrolu správnosti ligace byla z kultur *E. coli* TOP10 *pPICZαA::Mela* č. 1-7 a *E. coli* TOP10 *pGAPZαA::Mela* č. 1-5 izolována plazmidová DNA a podrobena restrikci endonukleasami *Acc65I* (který rozpoznává stejné štěpné místo jako *Asp718I*) a *SacII*. Následná elektroforetická separace na agarosovém gelu potvrdila přítomnost genu *Mela* (přibližně 1400 bp) a rozštěpených vektorů *pPICZαA* a *pGAPZαA* (3000 až 4000 bp) (viz obrázek 22).



Obrázek 22 – Analýza restrikce plazmidů *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* za použití enzymů *Acc65I* a *SacII* z různých bakteriálních kolonií *E. coli* TOP10 pomocí agarosové elektroforézy.

Izolované plazmidy ze vzorků *E. coli* TOP10 *pPICZαA::Mela* č. 6 a 7 a *pGAPZαA::Mela* č. 1 a 4 byly zaslány do specializované firmy SEQme s.r.o. (Dobříš, ČR), kde byla osekvenována nukleotidová sekvence genu *Mela* za použití primerů rozeznávajících specifickou sekvenci v *pPICZαA* a *pGAPZαA* vektoru. U vzorků *pPICZαA::Mela* č. 7 a *pGAPZαA::Mela* č. 4 byla vyloučena přítomnost případných mutací a tím byla potvrzena správnost sekvence vloženého genu *Mela* (viz obrázek 23). Na základě výsledků sekvenování byly pro další experimenty (příprava expresního systému) zvolené právě tyto dva konstrukty *pPICZαA::Mela* č. 7 a *pGAPZαA::Mela* č. 4.

```

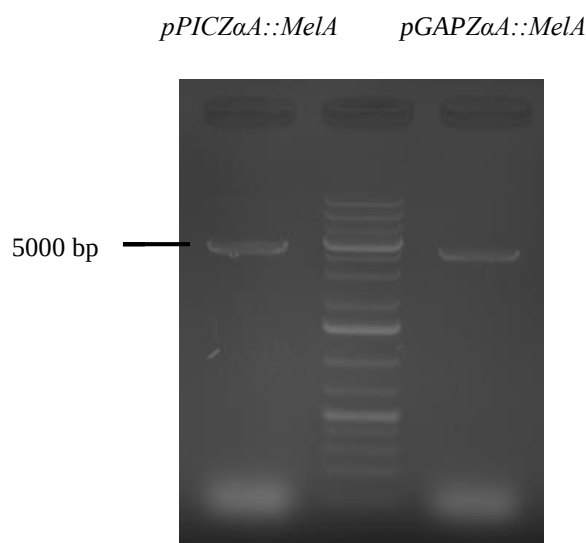
ATGAAAAAGATTACATTTATCGGTGCAGGGAGCACGATTTTCGCCAAAAATGTTTTGGGAGACTGCCTGT
TAACAGAAGCACTGAATGGATTTGAGTTCGCTCTTTACGACATTGATCCCAAACGCCTGCAGGAATCCCA
GCTCATGCTCGAAAAATCTAAGAGACCGTTATAACCCAAGTGTGGCCATCAACAGCTATGATGACAGAAAA
CTCGCCTTGCAAAACGCAGGCTATGTCATCAATGCGATTGAGTTGGAGGATACAAACCGAGCACAGTCA
TCGATTTGAGATTCTTAAACGGTATGGGCTGCGCCAGACGATCGCCGATACAGTCGGCATCGGCGGGAT
ATTGAGATCTCTCAGAACAATCCCGGTCTTATTTGATATCGCAAAAGATATGGAGGAAATGTGCCCTGAC
GCATGGTCTCTTAACTATACAAATCCAATGGCCACTCTTACAGGCGCCATGCTCCGCTATACCAATATCA
AAACAATCGGGCTCTGCCACAGTGTTCAAGTGTGCACGAAGGATTTATTTAAAGCTCTCGGAATGGAGCA
TGACGGAATTGAGGAACGCATCGCGGGAATCAATCATATGGCTTGGCTTTTGGAAAGTCAAAAAAGACGGC
ACAGATTTATATCCAGAAATCAAAAGGAGAGCGAAAGAAAAACAAAAACAAAGCATCATGATATGGTGC
GGTTTGAATTAATGGATAAGTTCGGCTATTATGTACGGAATCGTCCGAACATAACGCAGAGTATCACCC
ATACTTTATTAAACGAAATTACCCTGAACTGATCAGCGAGCTGCAAATCCCGCTCGACGAATATCCGAGA
AGGTGCGTCAAGCAGATTGAAAATTGGGAGAAAATGCGGGATGATATCGTCAACAATAAAACCTTACGC
ACGAACGCTCAAAAGAATATGGTTCAAGAATTATAGAAGCAATGGAAACAAACGAACCATTACCTTCGG
AGGAAAACGTCTTGAATACAGGGCTGATCGCCAACCTTCCTTCAAAAGCGGTTGTGGAAGTGACATGCGTC
GCCGACAGAAAAAAATTACACCGTGCTTCGCCGGAGAACTGCCTGAGCAGCTTGCCGCCTTAAACCGGA
CGAATATTAATACACAGCTGATGACAATCGAAGCGGCTGTACACGGAAGAAAGCGGTTTACCAAGC
TGCAATGCTTGATCCGCATACAAGCGCGGAGCTTTCCATGAAGGACATCATCTCCATGTGTGACGATTTA
TTTGAGCACACGGCGATTGGCTTCCGGAATACAAATAA

```

Obrázek 23 – Sekvence genu *Mela*.

4.2 Příprava expresního systému *P. pastoris* X-33

Linearizací plazmidu v místě homologie se mnohonásobně zvýší frekvence jeho začlenění do genomu. Pro účinnu integraci plazmidu do genomu kvasinek je tedy nevyhnutelné vkládaný plazmid nejprve linearizovat. Připravené plazmidy *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* (Kapitola 4.1) byly linearizované restrikčními enzymy *SacI* a *AvrII*. Malá část linearizované směsi byla analyzovaná pomocí elektroforetické separace, kdy na gelu byly detekovány pásy o velikosti 4000 až 5000 bp, což odpovídá těmto linearizovaným vektorům o reálné velikosti *pGAPZαA::Mela* 4431 bp a *pPICZαA::Mela* 4877 bp (viz obrázek 24).

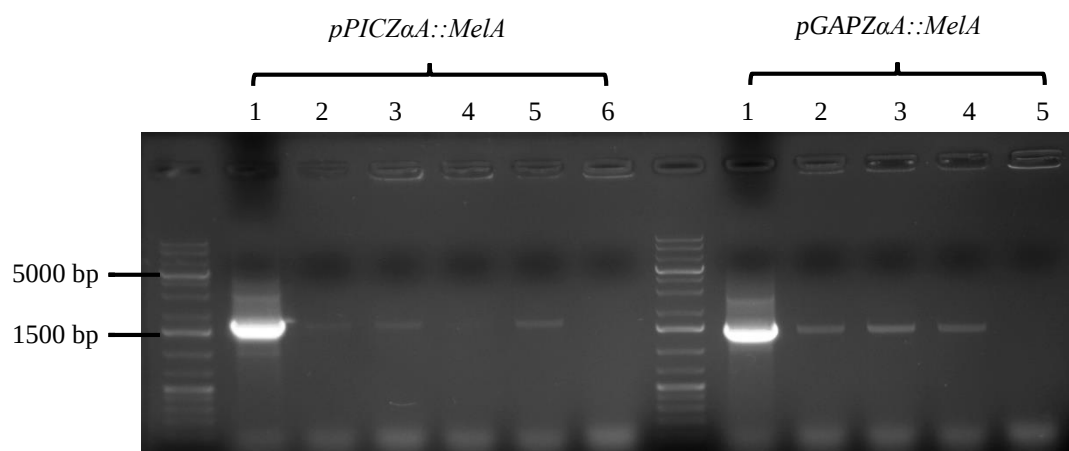


Obrázek 24 – Linearizované plazmidy *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* analyzované za použití agarosové elektroforézy.

Směs linearizovaných vektorů *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* byla přečištěna fenol-chloroform-isoamylalkoholovou extrakcí pro odstranění ostatních reakčních složek, které by mohly snížit nebo dokonce inhibovat transformaci elektrokompetentních buněk *P. pastoris* X-33. Po transformaci byly kvasinky s pravděpodobně transformovanými plazmidy selektovány na YPDS agarových plotnách s obsahem zeocinu. Na plotnách narostlo několik desítek kolonií, z kterýchbyly vybrány 4 kolonie od každého plazmidu a následně inokulovány do tekutého YPD média s obsahem zeocinu. U kultury *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* narostly všechny 4 vzorky kdežto u kultury *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* narostly pouze 3 ze 4 vzorků.

Správnost transformace byla ověřena metodou Colony PCR (viz kapitola 3.2.16), kde jako templát byla použita část kolonie narostlé na YPDS agaru, s následnou elektroforetickou separací produktů reakce na agarosovém gelu (obrázek 25). Pozitivní kontrola (vyizolované plazmidy *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela*) byla v jamkách označených číslem 1. Negativní kontrola (netransformovaná kultura *P. pastoris* X-33) byla nanesena do jamek 6 a 5. Páry vzorků *pPICZαA::Mela* 2-5 byly slabě viditelné, ale přesto vyšly pozitivně. Na gelu byl vidět produkt odpovídající genu *Mela* o velikosti přibližně 1500 bp, taktéž vzorky *pGAPZαA::Mela* 2-4 vyšly pozitivně a byla u nich prokázána transformace rekombinantního plazmidu.

Plazmidy *pPICZαA::Mela* a *pGAPZαA::Mela* byly úspěšně linearizovány, přečištěny fenol-chloroform-isoamylalkoholovou extrakcí a transformovány do expresního systému *P. pastoris* X-33.



Obrázek 25 – Ověření transformace rekombinantních plazmidů. 1 – pozitivní kontrola *pPICZαA::Mela*; 2-5 vzorky *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela*; 6 – negativní kontrola *P. pastoris* X-33. 1 – pozitivní kontrola *pGAPZαA::Mela*; 2-4 vzorky *P. pastoris* X-33 *pGAPZαA::Mela*; 5 – negativní kontrola *P. pastoris* X-33.

4.3 Optimalizace exprese *Mela* v *P. pastoris* X-33

Po linearizaci, přečištění a úspěšné transformaci vektorů *pGAPZαA::Mela* a *pPICZαA::Mela* do *P. pastoris* X-33 byla sledována exprese α -galaktosidasy v různých expresních médiích. Vyzkoušeny byly přídavky indukčních látek (glukosa pro *pGAPZαA::Mela* a methanol pro *pPICZαA::Mela*) a vzorky byly odebírány ve 24 h intervalech po dobu 5-7 dnů.

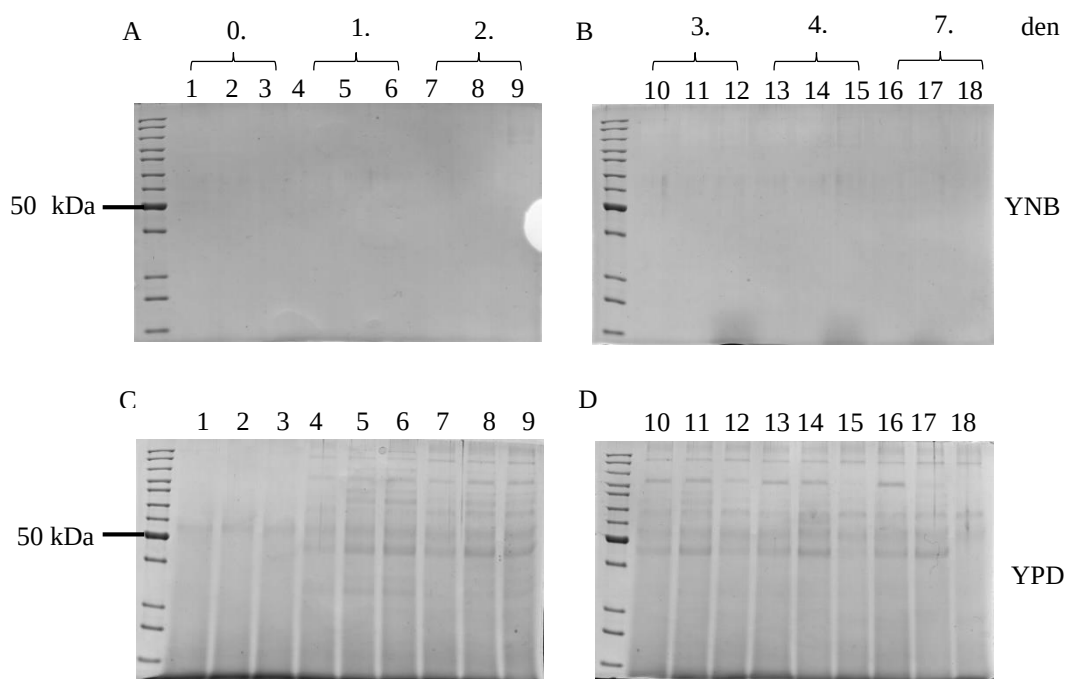
4.3.1 Exprese genu *Mela* z vektoru *pGAPZαA*

Optimalizace exprese byla provedena pro pozitivně transformované *P. pastoris* X-33 plazmidem *pGAPZαA::Mela*, vůči kterým byly jako negativní kontrola použity kvasinky *P. pastoris* X-33 transformované prázdným plazmidem *pGAPZαA*. Tyto kultury byly inokulovány do 2 ml YPD a YNB média s obsahem zeocinu. Po rozkultivování byly kultury přeneseny do 50 ml YPD a YNB expresního média tak, aby OD_{600} odpovídalo hodnotě 1 (viz tabulka 10). Po 24 h intervalech byla do jednoho ze vzorků přidávána glukosa na celkový obsah 0,5 %, a z každého média byly odebrány 2 ml vzorku. Exprese α -galaktosidasy do média byla detekována pomocí SDS-PAGE (obrázek 26).

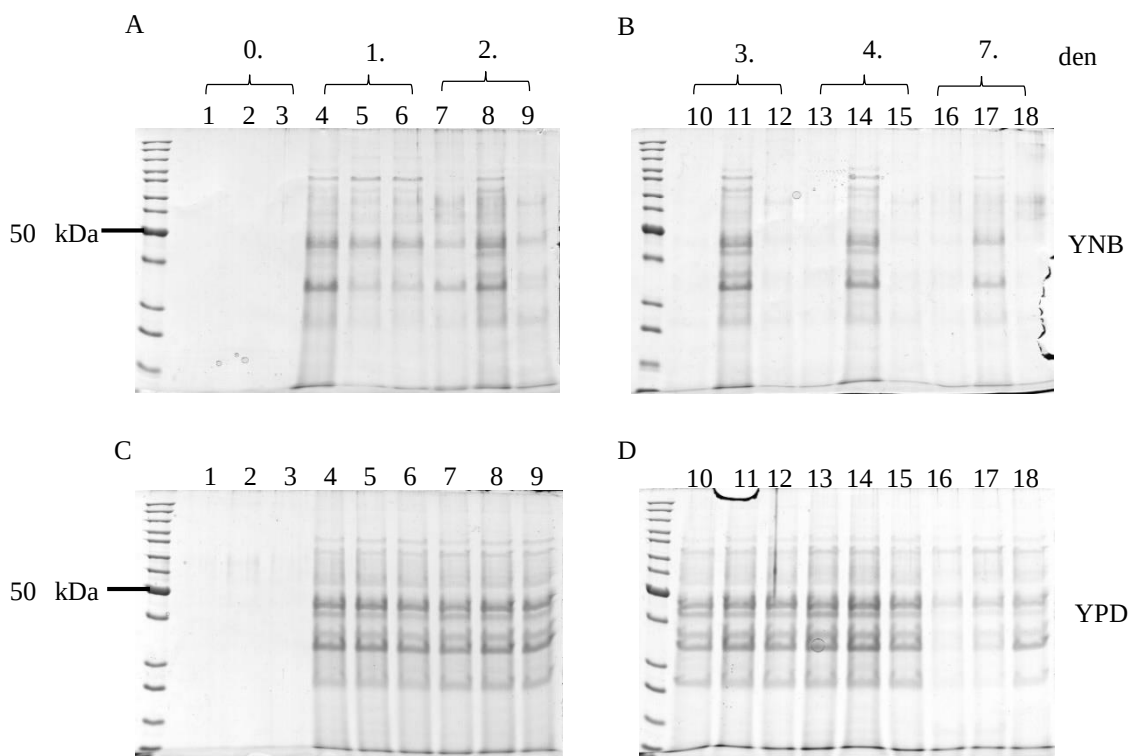
Na gelech bohužel nebyly detekovány pásy odpovídající molekulové velikosti α -galaktosidasy (49 kDa). Pro případ skryté exprese byla provedena také analýza peletů buněk (obrázek 27), avšak bez prokazatelných výsledků přítomnosti α -galaktosidasy. Jednou z možných příčin negativní detekce mohla být nízká koncentrace exprimované α -galaktosidasy. Z tohoto důvodu jsme se dále rozhodli přejít k měření aktivity α -galaktosidasy pomocí spektrofotometrie, což je všeobecně považováno za citlivější metodu, pokud je vzniklý protein dostatečně aktivní.

Tabulka 10 – Inokulace *P. pastoris* X-33 s různými vektory do expresních médií YPD a YNB.

Vzorek č.	Typ vektoru	Médium
1	pGAPZ α A	YPD
2	<i>pGAPZαA::Mela</i>	
3	<i>pGAPZαA::Mela</i> + glukosa	
1	pGAPZ α A	YNB
2	<i>pGAPZαA::Mela</i>	
3	<i>pGAPZαA::Mela</i> + glukosa	



Obrázek 26 – Analýza exprese YNB a YPD médií kultury *Pichia pastoris* X-33 *pGAPZ α A::Mela* pomocí SDS-PAGE. Vzorky jsou uspořádány po dnech v pořadí: 1 – pGAPZ α A; 2 – *pGAPZ α A::Mela*; 3 – *pGAPZ α A::Mela* + glukosa. Vzorky pokračují podle stejného vzorce až po jamku 18. 0.-7. označují dny, kdy byly vzorky odebírané.



Obrázek 27 – Analýza exprese peletů buněk *Pichia pastoris* X-33 *pGAPZαA::Mela* pomocí SDS-PAGE. Vzorky jsou uspořádány po dnech v pořadí: 1 – *pGAPZαA*; 2 – *pGAPZαA::Mela*; 3 – *pGAPZαA::Mela* + glukosa. Vzorky pokračují podle stejného vzorce až po jamku 18. 0.-7. označují dny, kdy byly vzorky odebírané.

4.3.2 Exprese genu *Mela* z vektoru *pPICZαA*

Pozitivně transformované *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* mohou být fenotypu Mut^+ nebo Mut^S . Fenotyp Mut^+ obsahuje geny pro dva typy alkohol oxidasy (AOX1 a AOX2), kdežto Mut^S má gen pro AOX1 přerušen a využívá pouze AOX2 pro metabolismus methanolu. Kultivace v expresních médiích vyžaduje funkčnost obou AOX, proto byly kvasinky vyselektovány kultivací na MD a MM agarových plotnách. Kolonie, které narostly na obou plotnách, měly funkční oba geny pro AOX a tudíž byly fenotypu Mut^+ .

2 vzorky pozitivně transformovaných *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* fenotypu Mut^+ a 1 negativní kontrola (*P. pastoris* X-33 s prázdným plazmidem *pPICZαA*) byly inokulovány do 2 ml MGY, BMG a BMGY média s obsahem zeocinu. Po rozkultivování byly kultury přeneseny do 50 ml MM, BMM a BMMY expresního média tak, aby OD_{600} odpovídalo hodnotě 1 (viz tabulka 11). Po 24 h intervalech po dobu 7 dnů byl do jednoho ze vzorků pozitivně transformovaných *P. pastoris* X-33 *pPICZαA::Mela* fenotypu Mut^+ k indukci exprese přidáván methanol na celkový obsah 0,5 %, a z každého média byly

odebrány 2 ml vzorku. Týto vzorky byly následně podrobené spektrofotometrickému měření aktivity α -galaktosidasy jelikož detekce α -galaktosidasy v médiu pomocí SDS-PAGE u *P. pastoris* X-33 transformované plazmidem *pGAPZ α A::Mela* nebyla možná.

Tabulka 11 – Inokulace *P. pastoris* X-33 s různými vektory do expresních médií MM, BMM a BMMY.

Vzorek č.	Typ vektoru	Médium
1	pPICZ α A	MM
2	<i>pPICZαA::Mela</i>	
3	<i>pPICZαA::Mela</i> + methanol	
1	pPICZ α A	BMM
2	<i>pPICZαA::Mela</i>	
3	<i>pPICZαA::Mela</i> + methanol	
1	pPICZ α A	BMMY
2	<i>pPICZαA::Mela</i>	
3	<i>pPICZαA::Mela</i> + methanol	

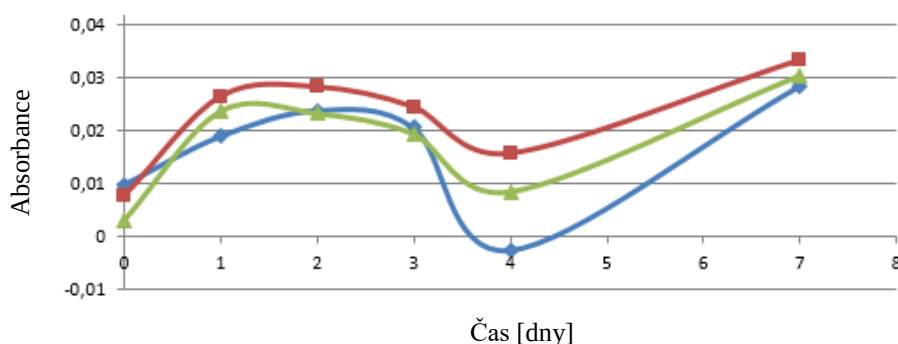
4.3.3 Měření aktivity α -galaktosidasy

Přítomnost α -galaktosidasy byla ve vzorcích supernatantu média detekována spektrofotometrickým měřením absorbance 4-nitrofenolu při 410 nm (podle studie Katrolia *et al.*, 2014), který vzniká katalytickou reakcí α -galaktosidasy se substrátem 4-nitrofenyl- α -D-galakopyranosidem. Naměřená data byla uspořádána do grafů (MM médium viz obrázek 28; BMM viz obrázek 29; BMMY viz obrázek 30), které zobrazují míru exprese v jednotlivých dnech.

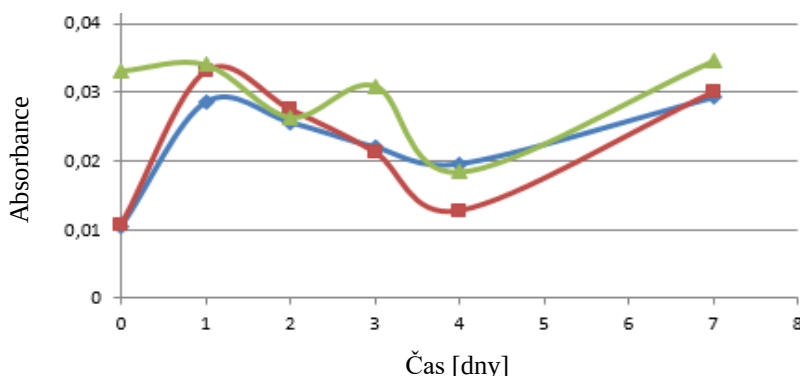
Jako pozitivní kontrola byla použita kultura *B. subtilis* var. *natto* obsahující gen *Mela*, ze kterého je produkovaná α -galaktosidasa přirozeně. Tento gen byl synteticky připraven a použit pro přípravu rekombinantního proteinu v kvasinkách. Pro přípravu jednotlivých vzorků pozitivní kontroly byla použita buněčná suspenze *B. subtilis* var. *natto* nebo médium, ve kterém byla kultura kultivována. Negativní kontrola se skládala ze stejných reagensů, ale bez přídavku jakéhokoliv enzymatického roztoku (viz obrázek 31).

Z analýzy MM a BMM média je vidět mírný nárůst aktivity α -galaktosidasy u vzorků s vloženým genem *Mela* oproti vzorku obsahujícímu pouze prázdný vektor. V BMMY médiu rostly kvasinky nejrychleji, proto je zde možné pozorovat zvýšené hodnoty absorbance u všech analyzovaných vzorků. Na základě naměřených výsledků

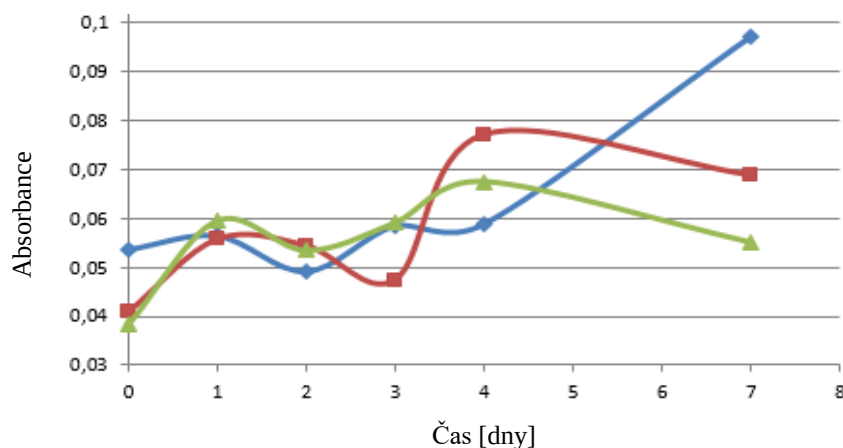
lze však vyvodit jenom předběžný závěr a to, že pravděpodobně nejvhodnější podmínky exprese byly v expresním médiu BMM nebo BMMY pro *P. pastoris* X-33 transformovanou *pPICZαA::Mela* po indukci methanolem při kultivaci 3 dny (obrázek 29 a 30). Hodnoty absorpance u médií však celkově vykazují značné výkyvy, a aktivitu α -galaktosidasy tak nejde jednoznačně vyhodnotit. Děje se tak zřejmě kvůli chybám v pipetování či při samotném měření vzorků. Není proto možné vyvodit jasný závěr, které médium a jaké podmínky jsou pro expresi α -galaktosidasy nejvhodnější. Tato problematika však může být předmětem dalšího výzkumu.



Obrázek 28 – Absorbance 4-nitrofenolu při 410 nm ze vzorků expresního média MM z různých kultur *P. pastoris* X-33. Modrá křivka značí vektor pPICZαA, zelená *pPICZαA::Mela* + methanol, červená *pPICZαA::Mela*.

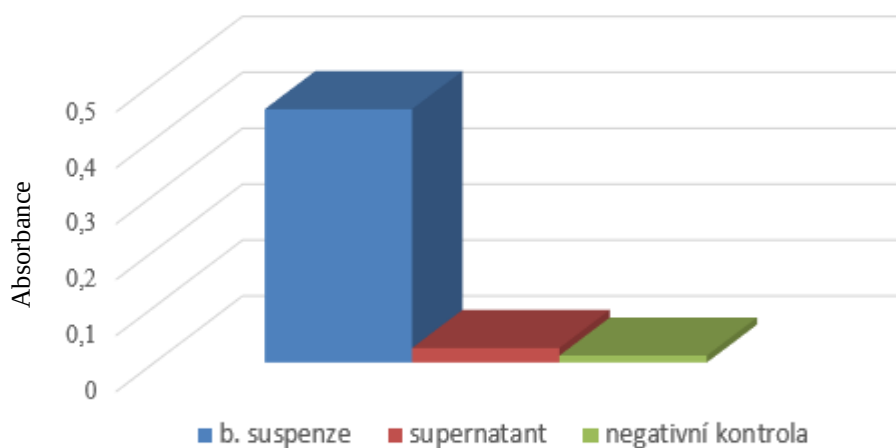


Obrázek 29 – Absorbance 4-nitrofenolu při 410 nm ze vzorků expresního média BMM z různých kultur *P. pastoris* X-33. Modrá křivka značí vektor pPICZαA, zelená *pPICZαA::Mela* + methanol, červená *pPICZαA::Mela*.



Obrázek 30 – Absorbance 4-nitrofenolu při 410 nm ze vzorků expresního média BMMY z různých kultur *P. pastoris* X-33. Modrá křivka značí vektor pPICZαA, zelená pPICZαA::Mela + methanol, červená pPICZαA::Mela.

Data naměřená pro pozitivní kontroly podporují výše zmínené výsledky. Ani zde nebylo možné detekovat výrazný rozdíl v absorbanci při 410 nm (viz obrázek 31). Zvýšená absorbance byla detekována pouze u kontroly, kde byla použita buněčná suspenze. Právě přidavek této bakteriální suspenze mohl způsobit zvýšení absorbance (zvýšení turbidity měřeného roztoku), a proto není možné potvrdit správnost zvolené detekční metody pro měření aktivity α -galaktosidasy, což může být jedním z dalších důvodů, proč nebylo možné jednoznačně stanovit nejvhodnější podmínky exprese.



Obrázek 31 – Absorbance 4-nitrofenolu při 410 nm ze vzorků pozitivní a negativní kontroly. Modrá barva představuje vzorek buněčné suspenze *B. subtilis* var. *natto*, červená médium kultury *B. subtilis* var. *natto* a zelená negativní kontrolu.

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na sacharidy a jejich výskyt v sóji luštinaté jako součástí potravy, krmných směsí s ohledem na její nutriční vlastnosti a metabolismus hospodářských zvířat. Pozornost byla také věnována charakterizaci, funkci a využití α -galaktosidas.

Hlavním cílem práce bylo připravit rekombinantní α -galaktosidasu z *Bacillus subtilis* var. *natto*. Podařilo se nám úspěšně připravit inducibilní *pPICZaA::Mela* a konstitutivní *pGAPZaA::Mela* plazmid, které byly následně transformovány do bakterií *E. coli* TOP10 pro jejich úschovu a pomnožení. Navazující linearizací připravených plazmidů a jejich úspěšnou transformací pomocí elektroporace do kvasinek *P. pastoris* X-33 se nám podařilo připravit expresní systém pro přípravu rekombinantní α -galaktosidasy.

Expresi α -galaktosidasy nebylo však možné detekovat, jak už bylo výše zmíněno, pomocí SDS-PAGE, pravděpodobně kvůli příliš nízké koncentraci α -galaktosidasy v médiu. Proto bylo přistoupeno k citlivější metodě měření aktivity pomocí spektrofotometru. Změřená data však také nepřinesla přímý důkaz aktivity rekombinantního enzymu. V budoucnu by bylo možné pokračovat zakoncentrováním získaného média, ve kterém by se měla nacházet rekombinantní α -galactosidasa, a opět proměřit vzorky, což ale nebylo z časových důvodů možné uskutečnit v rámci této bakalářské práce. Časové rozmezí pro samotnou kultivaci, následnou analýzu pomocí SDS-PAGE a spektrofotometrické proměření vzorků se pohybuje kolem dvou až tří týdnů. Další možností je také optimalizace samotné metody detekce aktivity.

6 REFERENCE

6.1 Literární zdroje

- Ademark P., de Vries R. P., Haegglund P., *et al.* (2001): Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an α -galactosidase and a β -mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2982-90.
- Anagnostopoulos, C., Courtois, J., E., Petek, F. (1954): L'action transférante de l' α -galactosidase du café. *Bull Soc Chim Biol* **36**, 1115-1123.
- Baik, S. H., Saito, K., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F., (2000): Molecular cloning and high-level expression in *Escherichia coli* of fungal α -galactosidase from *Absidia corymbifera* IFO8084. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 168-173.
- Balasubramaniam, K., Dey, P., M., Pridham, J., B. (1974): Association and Dissociation of α -Galactosidase of Coconut (*Cocos nucifera typica*) *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 1128-1130.
- Biranjan, J. R., D. R. Ingole, and S. R. Sanyal. (1987): Utility of soymilk in dietary therapy of undernourished children. *Indian Med. Gaz.* **9**, 313-316.
- Blesák, K. and Janeček, S. (2012): Sequence fingerprints of enzyme specificities from the glycoside hydrolase family GH57. *Extremophiles.* **3**, 497-506.
- Bouma, C., L., Reizer, J., Reizer, A., Robrish, S., A., Thompson, J. (1997): 6-phospho- α -D-glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*: cloning, expression, and assignment to family 4 of the glycosylhydrolases. *J. Bacteriol.* **179**, 4129-4137.
- Brandi L. Cantarel, Pedro M. Coutinho, Corinne Rancurel, Thomas Bernard, Vincent Lombard and Bernard Henrissat (2008): The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 233-238.
- Brumer, H., Sims, P. F., Sinnott, M. L. (1999): Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: purification and characterization of the main α -galactosidase. *Biochem J.* **339**, 43-53.
- Campbell, N., A., and Reece, J., B., (2008): Biologie, Computer Press, vyd. 1., ISBN 8025111784.
- Cantarel, B., L., Coutinho, P., M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009): The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 233-238.
- Cao, Y., Wang, Y., Luo, H., Shi, P., Meng, K., Zhou, Z., Zhang, Z., Yao, B., (2009a): Molecular cloning and expression of a novel protease-resistant GH-36 α -galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1295-1300.
- Cao, Y., Y. Wang, K. Meng, Y. Bai, P. Shi, H. Luo, et al. (2009b): A novel protease-resistant α -galactosidase with high hydrolytic activity from *Gibberella* sp. F75: Gene cloning, expression, and enzymatic characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 875-855.
- Clarke, J. H., K. Davidson, J. E. Rixon, J. R. Halstead, M. P. Fransen, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. (2000): A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 661-667.
- Comfort, D. A., K. S. Bobrov, D. R. Ivanen, K. A. Shabalin, J. M. Harris, A. A. Kulminskaya, H. Brumer, and R. M. Kelly. (2007): Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36 α -galactosidase (*TmGalA*) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases. *Biochemistry* **46**, 3319-3330.
- Coon, C., N., Leske, K., L., Akavanichan, O., Cheng, T., K., (1990): Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. *Poult. Sci.*, **69**, 787-793.
- Courtois J., E., Petek, F. (1957): Obtention d'épimélibiose par action transférante de l' α -galactosidase. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**, 715-723.
- Cruz, R. and Y. K. Park. (1982): Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. *J. Food Sci.* **47**, 1973-1975.
- Dey, P. M., Patel, S., Brouwnleader, M. D., (1993): Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 361-371.

- Dey, P., M., Pridham, J., B. (1969): Substrate specificity and kinetic properties of α -galactosidases from *Vicia faba*. *Biochem J.* **115**, 47-54.
- Dey, P., M., Pridham, J., B. (1972): Biochemistry of α -galactosidases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **36**, 91-130.
- Dey, P., M., Wallenfels, K. (1974): Isolation and characterization of α -galactosidase from *Lens esculanta*. *Eur. J. Biochem.* **50**, 107-112.
- Dostálová, J. (2003), *Nutriční hodnota sóji*, Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT, Praha, Česká republika.
- Duranti, M., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Tedeschi, G., Morazzoni, P. (2003): One-step purification of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Prot. Express. Purif.* **30**, 167-170.
- Ernst, H., A., Lo Leggio, L., Willemoës, M., Leonard, G., Blum, P., Larsen, S. (2006): Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *J. Mol. Biol.* **358**, 1106-1124.
- Falkoski, D. L., V. M. Guimarães, C. M. Callegari, A. P. Reis, E. G. De Barros, and S. T. De Rezende. (2006): Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α -galactosidases. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 10184-10190.
- Ferreira, J. G., Reis, A. P., Guimaraes, V. M., Falkoski, D. L., da Fialho, L. S., de Rezende, S. T. (2011): Purification and characterization of *Aspergillus terreus* α -galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 1111-1125.
- Franco-Fraguas, L., Pla, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suarez, N., Batista-Viera, F. (2003): Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J. Chromatography B*, **90**, 365-372.
- Fukusumi, S., Kamizono, A., Horinouchi, S., Beppu, T. (1988): Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur. J. Biochem.* **174**, 15-21.
- Garman, S., C. (2006): Structural studies on alpha-GAL and alpha-NAGAL: The atomic basis of Fabry and Schindler diseases. *Biocatal. Biotransform.* **24**, 129-136.
- Garman, S., C. (2007): Structure-function relationships in alpha-galactosidase A. *Acta Paediatr.* **96**, 6-16.
- Ghazi, S., Rooke, J. A., Galbraith, H. (2003): Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. *Br. Poult. Sci.* **44**, 410-418.
- Girigowda, K., Kapnoor, S. S., Kulkarni, D., Mulimani, V. H. (2007): Degradation of raffinose oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1430-1436.
- Gitzelmann, R., Auricchio, S. (1965): The handling of soy alpha-galactosidase by a normal and galactosemic child. *Pediatrics.* **36**, 231-235.
- Godbole, S. S., B. S. Kubal, and S. F. D'Souza. (1990): Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread. *Enz. Microb. Technol.* **12**, 214-217.
- Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2009): A novel α -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 471-477.
- Gray, K. A., L. Zhao, and M. Emptage. (2006): Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 141-146.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* **316**, 695-696.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997): Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
- Hill, R., W., Gordon, A., Anderson, M. (2008): Animal physiology, vyd. 2., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-317-4.
- Holeček, M. (2006): *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing, s. 288.

- Hughes, R., C. (1972) The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles. *Essays Biochem.* **11**, 1.
- Chen, Y., M. Jin, T. Esborge, G. Coppola, J. Andre, and D. H. Calhoun. (2000): Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human α -galactosidase A produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **20**, 472-484.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. (2001): The defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 2191-2209.
- Jindou, S., Karita, S., Fujino, E., Fujino, T., Hayashi, H., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., (2002): α -Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* **184**, 600-604.
- Karlson, P. (1981): *Základy biochemie*, Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, s. 501.
- Katrolia P., Rajashekhara E., Yan Q., Jiang Z. (2014): Biotechnological potential of microbial α -galactosidases. *Critical Reviews in Biotechnology* **34**, 307-317.
- Koshland, D., E. (1953): Stereochemistry and the mechanism of enzyme reactions. *Biol. Rev.*, **28**, 416-436.
- Kotiguda, Girigowda, Shankar S. Kapnoor, Dhananjay K., Veerappa H. M. (2007): Degradation of Raffinose Oligosaccharides in Soymilk by Immobilized α -Galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1430-1436.
- Kumar, A. and Gupta, M. N. (1994): Affinity precipitation of trypsin with soybean trypsin inhibitor linked Eudragit S-100. *Journal of Biotechnology*, **37**, 185-189.
- Laderman, K., A. Asada, K., Uemori, T., Mukai, H., Taguchi, Y., Kato, I., Anfinsen, C., B. (1993): Alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24402-24407.
- Lesley, S., A. Kuhn, P., Godzik, A., Deacon, A., M., Mathews, I., Kreusch, A., Spraggon, G., Klock, H., E., McMullan, D., Shin, T., Vincent, J., Robb, A., Brinen, L., S., Miller, M., D., McPhillips, T., M., Miller, M., A., Scheibe, D., Canaves, J., M., Guda, C., Jaroszewski, L., Selby, T., L., Elsliger, M., A., Wooley, J., Taylor, S., S., Hodgson, K., O., Wilson, I., A., Schultz, P., G., Stevens, R., C. (2002): Structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **99**, 11664-11669.
- Li, Y., T., Shetlar, M., R. (1964): Occurrence of alpha-galactosidase in higher fungi: Isolation of alpha-galactosidase from *Calvatia cyathiformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 523-530.
- Liener, I. E. (1994): Implications of antinutritional components in soybean foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **34**, 31-67.
- Linden, J. C., (1982): Immobilized α -D-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microbiol. Technol.* **4**, 130-136.
- Lodge, J., A., Maier, T., Liebl, W., Hoffmann, V., Sträter, N. (2003): Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-glucosidase AglA defines a new clan of NAD⁺-dependent glycosidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 19151-19158.
- Lombard, V., Golaconda, H., Drula, E., Coutinho, P., M., Henrissat, B. (2014): The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, 490-495.
- MacGregor, E., A., Janecek, S., Svensson, B. (2001): Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochem. Biophys. Acta.* **1546**, 1-20.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M. K. Bhat. (2000): Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **64**, 461-488.
- Marquez, M. C. and Alonso, R. (1999): Inactivation of trypsin inhibitor in chickenpea. *J. of Food Comp. and Analysis.* **12**, 211-217.
- Mayes, P., A. (1998). In: Murray, R., Granner, D., K., Mayes, P., A., Rodwell, V., W. *Harperova biochemie*. Vyd. 3, Praha: H and H, s. 137-145. ISBN 8073190133
- Messina, M. J. (1999): Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 439-450.

- Mi, S., K. Meng, Y. Wang, Y. Bai, T. Yung, H. Luo, and B. Yao. (2007): Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. *Enz. Microbial Technol.* **40**, 1373-1380.
- Minkevič, I., A., Borkovskij V., J. (1953) Olejny. (Překlad z ruského originálu Masličnyje kultury, Selchozgiz Moskva 1952). Vydání první. Praha: SZN. 394 s.
- Nakai, H., Baumann, M., Petersen, B. O., Westphal, Y., Hachem, M. A., Dilokpimol, A., Duus, J. O., Schols, H. A., Svensson, B. (2010): *Aspergillus nidulans* α -galactosidase of glycoside hydrolase family 36 catalyses the formation of α -galactooligosaccharides by transglycosylation. *FEBS J.* **277**, 3538-3551.
- nakladatelství, 398 s. ISBN 80-7022-042-2.
- Naumoff, D. G. (2004): Phylogenetic analysis of α -galactosidases of the GH27 family. *Molec. Biol.* **38**, 463-476.
- Ollson, M. L., C. A. Hill, H. de la Vega, Q. P. Liu, M. R. Stroud, J. Valdinocci, S. Moon, H. Clausen, and M. S. Kruskall. (2004): Universal red blood cells - enzymatic conversion of blood group A and B antigens. *Transfus. Clin. Biol.* **11**, 3339.
- Osman, M. A., Reid, P. M., Weber, C. W. (2002): Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: Effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry.* **78**, 419-423.
- Petek, F. and Dong, T. (1961): Séparation et étude de deux graines du café. *Enzymologia* **23**, 133-142.
- Petek, F., Villarroya, E., Courtois, J., E. (1969): Purification et propriétés de l' α -galactosidase des graines germées de *Vicia sativa*. *Eur. J. Biochem.* **3**, 395-402.
- Prashanth, S. J. and Mulimani V. H. (2005): Soymilkoligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochem.* **40**, 1199-1205.
- Raasch, C., Streit, W., Schanzer, J., Bibel, M., Gossler, U., Liebl, W. (2000): *Thermotoga maritima* AglA, an extremely thermostable NAD⁺, Mn²⁺, and thiol-dependent α -glucosidase. *Extremophiles.* **4**, 189-200.
- Rada, V. (2007) Nutriční vlastnosti sójových sacharidů ve vztahu k nepřežvýkavcům. *Vědecký výbor výživy zvířat* **1**, 3-25.
- Rees, D., A. (1977): *Polysaccharide Shapes*. London: Chapman and Hall. ISBN 9789401169066.
- Rossi, R., Monteruccio, A., Ciarrocchi, G., Biamonti, G. (1997): Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2106-2113.
- Rozenfeld, P. A. (2009): Fabry disease: Treatment and diagnosis. *IUBMB Life* **61**, 1043-1050.
- Rye, C. S. and S. G. Withers. (2000): Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580.
- Shibuya, H., Nagasaki, H., Kaneko, S., Yoshida, S., Park, G. G., Kusakabe, I., Kobayashi, H. (1998): Cloning and high-level expression of α -galactosidase cDNA from *Penicillium purpogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4489-4494.
- Similä, J., Gernig, A., Murray, P., Fernandes, S., Tuohy, M. (2010): Cloning and expression of a thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1653-1663.
- Sinnott, M., L. (1990:) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202.
- Sissons, J., W., Smith, R., H., Hwitt, D., (1982): Prediction of the suitability of soya-bean products for feeding to preruminant calves by an *in vitro* immunochemical method. *Brit. J. Nutr.* **47**, 311-318.
- Skorňakov, S., Jeník, J., Větvička, V. (1991) Zelená kuchyně. 2. vyd. Praha: Lidové
- Smiricky, M., R., Grieshop, C., M., Albin, D., M., Wubben, J., E., Gabe, R., T., Fahey, G., C., (2002): The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. *J. Anim. Sci.* **80**, 2433-2441.
- Smith, A. K. and Circle J. J. (1972): Chemistry and Technology. In: *Soybeans*. CN AVI Publishing Co., Westport, CT, U. S. A., 462-486.
- Spangenberg, P., C. André, M. Dion, C. Rabiller, and R. Mattes. (2000): Comparative study of new [α]-galactosidases in transglycosylation reactions. *Carbohydr. Res.* **329**, 65-73.

- Thananunkul, D., M. Tanaka, C. O. Chichester, and T. C. Lee. (1976): Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortirella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. *J. Food Sci.* **41**, 173-175.
- Thippeswamy, S. and V. H. Mulimani. (2002): Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochem.* **38**, 635-640.
- Thompson, J., Pikis, A., Ruvinov, S., B., Henrissat, B., Yamamoto, H., Sekiguchi, J. (1998): The gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 encodes a metal-requiring, NAD(H)-dependent 6-phospho- α -glucosidase. Assignment to family 4 of the glycosylhydrolase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 27347-27356.
- Turner, P., G. Mamo, and E. Nordberg-Karlsson. (2007): Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* **6**.
- Van Damme Els, J. M., Peumans, W. J., Pusztai, A., Bardocz, S. (1997): Properties and biomedical applications. In: *Handbook of plant lectins*. Chichester, Wiley, UK, 224.
- Velíšek, J. (1999): *Chemie potravin 3*. 1st ed. Osis, Tábor, Česká republika 342 s.
- Viana, P. A., S. T. De Renende, V. M. Marques, L. M. Trevizano, F. M. L. Passos, M. G. A. Oliveira, M. P. Bemquerer, J. S. Oliveira, and V. M. Guimarães. (2006): Extracellular α -galactosidase from *Debaromyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2385-2391.
- Vocadlo, D., J. Davies, G., J., Laine, R., Withers, S., G. (2001): Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**, 835-838.
- Voet, E., Oers, L., Nikolic, I. (2005): Dematerialization. Not just a matter of weight. *International Journal of Industrial Ecology* **8**, 121-137.
- Wang, H., Luo, H., Li, J., Bai, Y., Huang, H., Shi, P., Fan, Y., Yao, B. (2010): An α -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with β -mannanase. *Bioresour. Technol.* **101**, 8376-8382.
- Williams, J., Villarroja, H., Petek, F. (1977): Purification and Properties of an α -D-Galactoside Galactohydrolase from the Seeds of *Trifolium repens* (White Clover). *Biochem. J.* **161**, 509-515.
- Yamashita, A., H. Hashimoto, K. Fujita, M. Okada, S. Mori, and S. Kitahata. (2005): Reverse reaction of *Aspergillus niger* α -galactosidase in a supersaturated substrate solution: Production of α -linked galactooligosaccharide (α -GOS). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1381-1388.
- Yip, V., L. and Withers S., G. (2006): Family 4 glycosidases carry out efficient hydrolysis of thioglycosides by an alpha, beta-elimination mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 6179-6182.
- Zhang, Y. P., F. Gong, G. Q. Bao, H. W. Gao, S. P. Ji, Y. X. Tan, *et al.* (2007): B to O erythrocyte conversion by the recombinant α -galactosidase. *Chinese Med. J.* **120**, 1145-1150.
- Zhu, A., C. Monahan, Z. Zhang, R. Hurst, L. Leng, and J. Goldstein. (1995): High-level expression and purification of coffee bean alpha-galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 65-70.

6.2 Internetové zdroje

- Biogen Praha s. r. o. home page: <http://eshop.biogen.cz/ogeneruler-1-kb-plus-dna-ladder-ready-to-use> (22. 4. 2016).
- Bunge North America home page: <https://www.bungenorthamerica.com/products/categories/15-soybeans> (2. 5. 2016).
- CAZypedia home page: <http://www.cazy.org/GH36.html> (28. 3. 2016).
- CAZypedia home page: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Classical_Koshland_retaining_mechanism (15. 4. 2016).
- CAZypedia home page: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#NAD-dependent_hydrolysis (15. 4. 2016).
- MojeChemie home page: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Metabolismus_Sacharid%C5%AF (21. 4. 2016).
- Proteopedia home page: <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/1zy9> (15. 4. 2016).

SnapGene home page: http://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/yeastplasmids/pGAPZ%28alpha%29_A/ (6. 4. 2016)
SnapGene home page: http://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/yeastplasmids/pPICZ%28alpha%29_A/ (6. 4. 2016).
University of Illinois at Chicago page: https://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/carbo%20metab%20cases/glycogen%20metab/Glycogen%20biochemistry.htm (3. 5. 2016).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AOX	alkohol-oxidasa
ATP	adenosintrifosfát
BMG	pufrované médium s minimálním obsahem glycerolu
BMGY	komplexní pufrované médium s glycerolem
BMM	pufrované médium s minimálním přídatkem methanolu
BMMY	komplexní pufrované médium s přídatkem methanolu
bp	páry bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FADH ₂	flavinadenindinukleotid redukována forma
Fru	fruktosa
Gal	galaktosa
GH	glykosylové hydrolasy
Glc	glukosa
kb	kilobáze
Man	manosa
MD	médium s minimálním přídatkem glukosy
MGY	médium s minimálním obsahem glycerolu
MM	médium s minimálním přídatkem methanolu
NAD	nikotinamidadenindinuklotid
NADPH	nikotinamiduadenindinukleotidfosfát
oNPG	ortho-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid
PCR	polymerázová řetězová reakce
pNPG	para-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid
rpm	počet otáček za minutu
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
sp.	druh
TAE	tris-acetátový EDTA pufr (tris acetate EDTA buffer)
TEMED	tetraethylmethylendiamid
TmGalA	α -galaktosidasa z <i>T. maritima</i>

var.	varianta
YNB	medium s kvasničným extraktem s obsahem síranu amonného
YPD	medium s kvasničným extraktem, peptonem a glukosou
YPDS	medium s kvasničným extraktem, peptonem, glukosou a sorbitolem