



Mgr. Ladislav Bumba, PhD.

Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů

Mikrobiologický ústav

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

Tel: 24106-2141

Fax: 24106-2152

E-mail: bumba@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na bakalářskou práci slečny Jitky Kručinské nazvanou „Construction of expression vector for cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“.

Bakalářská práce slečny Jitky Kručinské je předkládána v rozsahu 38 stran, a obsahuje velké množství přehledných obrázků a tabulek. Pod vedením zkušeného školitele se autorka zabývala, dle mého uvážení, vědecky velmi závažným tématem: přípravou expresního vektoru s vysokým počtem kopií pro expresi vybraného genu v sinici kmenu *Synechocystis* 6803. Vzhledem k nepřítomnosti jakéhokoliv klonovacího a expresního systému v tak modelovém organismu jakou je *Synechocystis* 6803, považuji výsledky získané a prezentované autorkou za mimořádně důležité.

Po formální stránce je práce členěna na 5 kapitol (Introduction, Experimental procedures, Results, Discussion, Conclusions) včetně 2 stran odkazů na vědeckou literaturu. Toto uspořádání je velmi běžné pro publikaci získaných výsledků ve formě vědeckého článku v odborném časopise. Proto předkládaná práce na mě působí jako manuskript publikace, který po drobných úpravách by mohl sloužit jako podklad pro recenzní řízení k přijetí publikace do tisku.

Práce má dobře sepsanou úvodní kapitolu (12 stran), která je doprovázena vhodně vybranými schémata a detailně čtenáře seznamuje nejen s expresními systémy v sinicích, ale i v tradičně používané bakterii *Escherichia coli*. Dále následují cíle práce, které jsou srozumitelně vytyčeny a odpovídají rozsahu bakalářské práce. V kapitole „Experimentální přístupy“ (6 stran) autorka popisuje a používá nejmodernější instrumentální metody, mezi něž patří kvantitativní PCR v reálném čase, PCR mutagenese, purifikace plasmidové DNA pomocí gradientu v CsCl₂ a mnoho dalších standardních technik používaných v molekulární biologii. Použití a popis metod je popsáno dobře, jen bych příště ocenil detailnější popis některých dílčích kroků (např. v odstavci RT-qPCR,Primers were designed and ordered by using the Roche web tool.....). V kapitole „Výsledky“ (12 stran) autorka detailně a velmi srozumitelně shrnuje dosažené výsledky své práce. Pomocí RT-qPCR autorka určila počet kopií HC plasmidu v buňce. Zároveň také popisuje jeho inzerční mutagenese pomocí homologií rekombinace, a nebo s využitím metod PCR amplifikace daného genu a jeho vkládání do plasmidu pomocí zásahových míst pro restriční endonukleázy. Autorka se během své práce potýkala s řadou problémů, jako např. relativně dlouhá doba pro selekci pozitivních klonů (14 dní), či zpětná homologní rekombinace vložených genů do chromosomální DNA. Musím ocenit, že autorka se nezalekla prvotních neúspěchů a pokračovala (a dosud pokračuje, jak je naznačeno v kapitole „Výsledky“) v přípravě těchto konstruktů pomocí purifikace plasmidů v CsCl₂ gradientu a spolu s vkládáním jiné než kanamycinové rezistence (erytromycin) a strukturně odlišných genů (GFP, PsbB). Bohužel musím konstatovat, že největší slabinou

této práce jsou legendy k obrázkům. Je to škoda, protože samotné obrázky jsou na velmi dobré úrovni a spolu s legendou tvoří páteř každé publikace či bakalářské práce. Popis k obrázkům je více než stručný, a většinou úplně chybí vysvětlení k hvězdičkám (např. Fig. 4.2, 4.13). Na 3 stranách „Diskuze“ autorka logicky porovnává získaná data s recentní literaturou a zabývá se hlouběji příčinami parciálních neúspěchů a nabízí jejich řešení v budoucnu. Práci uzavírá kapitola „Conclusions“, kde autorka shrnuje svá získaná data, která odpovídají zadaným cílům a nárokům na bakalářskou práci.

Dále pak musím ocenit, že celá práce je napsána v anglickém jazyce, což u bakalářské práce není zrovna standardní záležitostí. Práce je psaná dobrou angličtinou, která nevyniká nadměrnou květnatostí vyjadřování, ale představuje velmi dobrý standard vědeckého jazyka, a vyniká z hlediska dobré srozumitelnosti. Množství jazykových překlepů a nepřesností je vzhledem k rozsahu práce minimální.

Drobné poznámky:

- Chybí seznam zkratk
- Vyvarovat se slovíček typu „Surprisingly“ (s.26) či osobního přístupu k věci „.....This findings indicated to me...“ (s.34)
- „Homologous recombination“ a ne „homological recombination“ (s.34)

Jako podklad pro diskusi mám k autorce následující dotazy:

- Jakým způsobem byl nastaven „treshold“ u výstupu z RT-qPCR?
- Jaké typy promotorů byly použity, a jaké typy promotorů mohou být případně použity v budoucnu?
- Jaké jsou výhody a nevýhody, popř. rozdíly mezi vkládáním genu do plasmidu pomocí homologií rekombinace a s využitím unikátních restrikčních míst na plasmidu?
- U plasmidů můžeme na gelové elektroforéze rozpoznat 3 formy plasmidových struktur „circular“, „coiled“ and „supercoiled“. Byly tyto formy také detekovány u plasmidu pCC5.2?

Závěrem svého posudku konstatuji, že předkládaná bakalářská práce dosahuje vysokých kvalit, a to především i zásluhou dokonalého zázemí ve školitelské laboratoři. Práce prozrazuje vysokou píli, pečlivost a tvůrčí invenci autorky, která se jeví být v budoucnu vyvráslou a velmi produktivní tvůrčí vědeckou osobností. Autorce k práci z celého srdce blahopřeji, a přeji mnoho úspěchů nejen v další tvůrčí vědecké práci ale i v osobním životě. Z výše uvedených důvodů dle čl. 3 Studijního a zkušebního řádu BF JU **doporučuji** přijmout práci k obhajobě s hodnocením **výborně**.

V Praze dne 28.5.2007


Mgr. Ladislav Bumba, PhD.