

**Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.**  
**Sektor autotrofních mikroorganismů**  
**Opatovický mlýn, 37981 Třeboň**

-----  
Tel. 384340411  
Fax 384340415

Posudek na bakalářskou práci **Jiřího Hellera**

**Příprava rekombinantního PsbQ proteinu fotosystému II ze špenátu ke studiu vzájemných interakcí proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu.**

Jak již název napovídá, předložená práce se zabývá expresí a purifikací rekombinantního proteinu ze špenátu v *E. coli*. Hlavní důraz v práci je kladen na metodiku, autor se naučil a zvládnul celou řadu základních molekulárně genetických metod od PCR mutagenese, přes heterologní expresi proteinu, analýzu exprese pomocí SDS-PAGE až po klasické schéma purifikace proteinů. Podle cílů se práce zabývá i hodnocením sekvenačních dat, tuto část jsem však v práci nenašel.

Široce pojatý úvod zahrnuje vše od fotosyntézy přes proteiny kyslík-vyvíjejícího komplexu až po sekvenci příslušného expresního vektoru. Z kapitoly věnované struktuře proteinu PsbQ není zcela zřejmé že struktura tohoto proteinu je vyřešena a to především rentgenostrukturní analýzou. Nejasná je pouze struktura flexibilního N konce.

V metodické části není dostatečně objasněn rozdíl dvou použitých metodik bodových mutagenézí.

Výsledky jsou uspořádány poněkud chaoticky. Začínají růstovou křivkou expresního kmene B96 s pET plasmidem, pokračuje izolací pET plasmidu a jeho restriční analýzou, následuje bodová PCR mutagenese, restrikce klonovacího vektoru a ligace PCR produktu s nastíněním dalšího postupu získání mutantního PsbQ. Výsledky končí úspěšnou izolací a purifikací nemutovaného PsbQ.

Diskuse je naproti tomu uspořádána logicky a diskutuje dosažené výsledky. Zajímavá by byla diskuse toho proč nefungoval komerční kit na PCR mutagenezi.

K práci mám následující konkrétní připomínky:

Jak autor sám přiznává, potýkal se s překladem s angličtiny do češtiny a s neexistencí některých českých termínů. Některé přeložené věty nedávají smysl (str. 8, poslední věta) a termíny jako *ledově vychlazený etanol* a *vysoko-rychlostní vyvíjení kyslíku* působí nezvykle. Na práci jsou patrné i vlivy slovenské, např. *izolace plasmidu maxiprepom*.

Práce by si zasloužila důkladnější editaci, působí jako by byla dokončována ve spěchu. Např.

– jiné řádkování (str. 8)

- obrázek se překrývá s textem (str. 33)

Není mi jasné co je reverzibilní protein (str. 9)

Agarózový gel se zřejmě nepřipravoval z vody (str. 22)

Z růstové křivky je zcela zřejmé že exponenciální růst začíná mnohem dříve než při OD 0.6 (Str. 30)

Obr. 14, 15 – pravděpodobně se nejedná o 1 kbp ladder

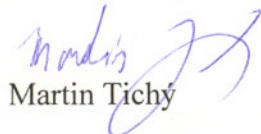
Na autora bakalářské práce mám následující dotazy:

Obr. 8 – proč má plasmid izolovaný MAXIPREPEM další band. Jedná se o kontaminaci chromozomální DNA?

Obr. 10 proč jsou u naštěpeného plasmidu přítomny 3 bandy když byly očekávány 2

Závěrem konstatuji, že bakalářská práce Jiřího Hellera splňuje požadavky na bakalářské práce kladené a proto doporučuji uvedenou práci přijmou k obhajobě a navrhuji hodnocení **v ý b o r n ě**

V Třeboni 21.5. 2008

  
Martin Tichý