



RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na bakalářskou práci Lucie Jedličkové

### **Izolace a analýza genu Salp25D, homologu glutathion-peroxidázy, klíštěte obecného *Ixodes ricinus***

V práci autorka řeší problematiku genu Salp25D, homologu glutathion-peroxidázy. Tento protein byl již dříve identifikován v klíštěti *Ixodes scapularis* a tato práce v podstatě potvrzuje velmi blízkou podobnost genů *I. ricinus* a *I. scapularis*. Jako cíle si autorka určila zpracování literární studie o problematice antioxidantní ochrany u klíštěte, dále pak analýzu exprese genu pro Salp25D pomocí molekulárně-biologických metod tj. PCR, klonování, sekvenace, exprese proteinu v bakteriálním systému. Autorka řeší expresi proteinu po sání klíštěte *I. ricinus* v jednotlivých tkáních a vývojových stádiích.

Práce je relativně přehledná, s množstvím obrázků a minimem překlepů. Má 39 stran, je členěna na literární studii a experimentální část obsahující materiály a metody, výsledky, diskuzi, závěr a použitou literaturu. Svým rozsahem odpovídá nárokům na bakalářskou práci. Autorka splnila vytyčené cíle práce, výsledky sepsala a diskutuje je s literárními zdroji.

K práci obecně mám tyto připomínky:

Autorka používá v některých odstavcích kostrbatou češtinu (připomíná anglický slovosled), grafickou úroveň obrázků snižují velmi úsporné popisky a tabulky jsou dost robustní. Autorka vychází zejména z publikace o Salp25D u *I. scapularis*, mohla proto rozlišit či označit jednotlivé klíštěcí molekuly, zejména v diskuzi skáče od Salp25D *I. scapularis* k Salp25D *I. ricinus* a zpět, čtenář se po několika větách ztrácí.

Dále pak, v literárním přehledu autorka zmiňuje v kapitole 3.3 obecně stresy následované tvorbou reaktivních kyslíkových skupin a enzymatické systémy eliminující je, ale chybí mi zde kapitola o tom **kdy a jak vzniká nadbytek reaktivních kyslíkových skupin u klíšťat, jak souvisí s interakcí klíštěte a hostitele či s jednotlivými tkáněmi** (některé informace jsou naznačeny v diskuzi či několika slovy na konci literárního přehledu) **a jaké mohou být biologické efekty oxidativního stresu.**

V kapitole Materiály a metody autorka neuvádí v tabulce primerů ty, které použila na amplifikaci fragmentu klonovaného do vektoru pCR<sup>®</sup>4-TOPO, dále opomněla výrobce kompetentních buněk (str. 22, 23) a kitu na izolaci plazmidů (str.23), není uveden autor návodu na přípravu gelu na SDS-PAGE (str. 24).

Na str. 26. v kapitole Výsledky autorka porovnává získanou sekvenci s databází, je pochopitelné, že podobnost s *I. scapularis* Salp25D bude vysoká. **Zajímala by mě homologie s glutathion-peroxidázami skupin organismů, které autorka zmiňuje v úvodu** (alignment či grafické srovnání sekvencí).

Hned při první PCR autorka používá gen-specifické primery, **byla tedy sekvence Salp25D I. ricinus již známa?** Autorka zmiňuje pouze částečnou sekvenci z GenBank.

V kapitole 6.5 autorka detekuje His-tag fúzní protein pomocí anti-His-tag protilátek, v tabulce 3 a u obr. 11 a 13 je však pro detekci uveden Ni-NTA konjugát, proč? **Jaký je rozdíl v detekci fúzních proteinů těmito reagensy?**

V kapitole 6.8 je řešena funkční aktivita rekombinantního proteinu, tato metoda není zmíněna v Materiálech a metodách. **Jak může být exprese genu optimalizována pro úspěšné stanovení funkční aktivity?**

Autorka diskutuje (str.32) **expresi Salp25D ve slinných žlázách, střevu a ovariích v souvislosti s působením antigenů z hostitelovy krve na tyto tkáně, může to autorka vysvětlit?**

Nejsilnější exprese byla pozorována u nasáté samice, **jaký může být mechanismus indukce exprese Salp25D? Proč je protein exprimován v ovariích?**

Závěrem:

Autorka zvládla základní metody molekulární biologie, úspěšně je aplikovala na studovaný gen pro Salp25D a dosažené výsledky diskutuje s literárními zdroji.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na bakalářskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení titulu Bakalář.

V Českých Budějovicích dne 26. 5. 2009

Lenka Grunclová

