



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 Ivany Pokorné

„Příprava rekombinantního inhibitoru serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus*“

V práci autorka řeší problematiku inhibitoru serinových proteáz IRS-1 a IRS-8 přítomných ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*.

Jako cíl si autorka určila produkci rekombinantních serpinů v bakulovirovém expresním systému a zpracování literárního přehledu o úloze serpinů ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*.

Práce je přehledná a poměrně srozumitelná. Má 45 stran, tradiční členění a svým rozsahem odpovídá nárokům na bakalářskou práci. Autorka splnila vytyčené cíle práce a výsledky úspěšně sepsala a diskutuje s množstvím literárních zdrojů.

K práci celkově mám tyto výhrady: Ačkoli je až na výjimky bez gramatických chyb a překlepů, čeština je zejména v kapitole úvod velmi kostrbatá, v kapitole materiál a metody bych uvítala přehled pufrů v tabulce místo v samostatných odstavcích textu, ve výsledcích pak autorka některé grafy průběhu čištění proteinu uvádí a jiné přesunuje do příloh. Graficky je práce úhledná s přehlednými tabulkami a obrázky.

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky:

Úvod:

Jak jsem zmínila je úvod kostrbatý a vzhledem k tomu, že autorka má jako cíl uveden literární přehled, přijde mi úsporný. Na str. 2 se autorka zamotala do pojmů domény a rodina proteinů, do kapitoly 1.4 nazvané Inhibitory serinových proteáz ve slinách klíšťat je nelogicky vloženo pojednání o vakcínách (str.3). Kdo je vlastně kdo u serpinů: Iris (Leboulle et al., 2002), IRS-1, 2, 4, 8 a IRIS-2 (Chmelař, 2005)?

Materiál a metody:

U navržených primerů pro amplifikaci a ligaci do bakulovirového plazmidu bych uvítala znázornění restrikčních míst, his-tagu a genspecifických úseků. U templátu není uvedeno z kterého dne sání je daná cDNA. Schéma PCR mě zaujalo teplotou nasedání, skutečně takto dlouhé primery nasedaly při 50°C (str.7)? Při další PCR poté autorka uvádí teplotu 55°C (str.11). V tabulce II., stejně jako v celé práci, by měla autorka sjednotit názvy genů (IRS-1 HT v. IRS1-HT). Na str.10 je chybně uvedeno složení LB ampicilinových ploten, u tekutého LB media chybí koncentrace ampicilinu (str.11). Centrifugace bakteriální kultury probíhala zřejmě při 16000 x g ne při 16 g, jak uvádí autorka na str.12. Zde bych se chtěla zeptat, proč autorka sekvenuje gen-specifickými primery a ne Bac1 a Bac2 primery pro pBacPAK9 plazmid? Dále pak, proč autorka použila rozdílné kobaltové kolony (TALON Superflow Metal Affinity Resin v. HiTrap IMAC FF) pro purifikaci proteinu? Jak byly vybrány enzymy pro biochemickou analýzu serpinu IRS-1?

Výsledky:

Geny IRS-1 a IRS-8 byly oba zaklonovány do pBacPAK9, ale poté IRS-8 není dále analyzován, proč? Předpokládaná velikost proteinu IRS-1 byla 46kDa, jaká byla skutečná velikost rekombinantu? Proč druhá exprese neproběhla v takové míře jako první experiment? Protein z které exprese a kterého čištění byl vybrán pro biochemickou analýzu a proč?

Diskuze:

Biochemická analýza IRS-1 podle autorky naznačuje, že se jedná o významný imunomodulační protein, prosím o bližší vysvětlení? Jaké budou následné experimenty? Co bude se serpinem IRS-8?

Autorka sepsala literární přehled, zvládla expresi proteinu v bakulovirovém expresním systému, jeho purifikaci a analyzovala biochemické vlastnosti IRS-1. Přes všechny připomínky, které k této práci mám, 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 17. 5. 2012


Lenka Grunclová