

RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
370 05

Oponentský posudek na bakalářskou práci Johany Mustacové

„Identifikace promotorů klíšťat pro využití v molekulárně biologických aplikacích“

Johana Mustacová ve své bakalářské práci řeší problematiku vhodných klíštěcích promotorů pro použití v klíštěcích buňkách. Jak autorka sama uvádí, správný výběr promotoru je základním předpokladem pro molekulárně biologické experimenty s klíštěcími buňkami. Předložená bakalářská práce čítá 27 stran včetně seznamu literatury. Práce má charakteristické členění a je rozdělena na úvod (literární přehled), kterému je věnováno 5 stran. Za ním následuje stránka, kde autorka čtenáře seznamuje s vytýčenými cíli projektu a kapitola Materiál a metody (8 stran), v níž autorka představuje použité kity, roztoky a všechny postupy, které si osvojila během své bakalářské práce. Dosažené výsledky jsou rozepsány na šesti stranách. Dále následují dvě stránky diskuze, závěr a seznam použité literatury. Oceňuji taky seznam zkratk používaných v textu (strana 1), i když některé zkratky v něm chybí (DEPC, DMEM, LB medium).

Úvod:

Úvodní část práce (Literární přehled) je sepsána mírně „kostrbatou“ češtinou, která často připomíná anglický slovosled a je rozdělena na dvě části. První část nese název Klíšťata a druhá Transfekce klíštěcích buněk. Obě kapitoly mají poměrně široký záběr (např. kapitola klíšťata obsahuje informace jak o nemocech přenášných klíšťaty tak i produkci rekombinantních proteinů). Zde bych doporučoval rozdělení do více podkapitol, což by dle mého názoru přispělo k lepší čitelnosti a orientaci v textu.

Dotazy a komentáře:

Kapitola klíšťata popisuje spíše onemocnění přenášná klíšťaty, ale o samotných klíšťatech zde moc informací není. Mohla by mi autorka uvést rozdíly mezi čeleděmi *argasidae* a *ixodidae*?

Materiál a metody:

Tato kapitola má 8 stran a seznamuje čtenáře s jednotlivými metodami, které si autorka během své práce osvojila. Autorka použila různé expresní vektory a navíc je modifikuje. Bohužel ale informace o těchto vektorech jsou v textu jen malé (obr 3, 8, 9 ale v nízké kvalitě). Ocenil bych, kdyby autorka vložila do textu mapy plazmidů s vyznačenými modifikacemi a primery, které během své práce použila.

Dotazy a komentáře:

Na co byl použit plazmid pET30a+? V práci jsem moc informací nenašel

Odkud byl amplifikován gen pro RFP?

Název kapitoly 3.1.2 neodpovídá následnému textu.

Tabulka III obsahuje sekvence všech primerů. Zde bych ocenil, pokud by kromě sekvence a annealingové teploty bylo uvedeno i využití primerů (např. amplifikace promotoru, klonování atd) a očekávaná velikost ampliconů.

V kapitole 3.2.8 se píše, že přítomnost plasmidů v buňkách byla ověřována pomocí colony PCR. Zde dle mého názoru jde o trochu nepřesnou formulaci, neboť už jenom fakt že kolonie vyrostou na plotně s antibiotikem je důkazem pro přítomnost plasmidu. Colony PCR se dělá pro ověření insertu. Byl klonovaný insert ověřován i jiným způsobem?

Autorka uvádí, že pro elektroporaci buněčné linie ISE6 bylo použito 7,2mil buněk a pro buněčnou linii IRE19 86.4mil. Proč tak markantní rozdíl?

Výsledky:

Kapitola výsledky čítá 6 stran a celkově 14 obrázků. Kvalita obrázků je s výjimkou obr. Č. 3, 8 a 9 dostatečná. Co považuji za ne úplně vhodně zvolené, jsou popisky u obrázků (např. velikosti markerů),

kteře jsou přímo vložene do obrázku. Dle mého názoru by byl obrázek přehlednější, pokud by se popis nacházel mimo.

Jednou z hlavní náplně autorčiny práce bylo klonování jednotlivých promotorů do expresních vektorů. Dle mého názoru je škoda, že tato část práce je zmíněna pouze v kapitole M&M a není součástí kapitoly výsledky. Jednak tím autorka pravděpodobně strávila hodně času a navíc by to usnadnilo interpretaci výsledků.

Dotazy a komentáře:

Z obr. 2 je patrné že ve vzorku 3 a 4 se nachází víc než jeden amplikon. Ověřovali jste ostatní amplikony? Jak byly purifikovány vzorky pro Gibson assembly?

Obsah obrázku 4 neodpovídá popisu v textu.

Co bylo použito jako negativní kontrola pro colony PCR?

Autorka použila metodu PCR pro optimalizaci elektroporace. Tato metoda mi nepřijde moc vhodná, neboť se jedná primárně o kvalitativní informaci (Ano/NE) která metoda by byla vhodnější pro kvantifikaci množství elektroporované plasmidové DNA v buňkách?

Na straně 18 autorka konstatuje, že metoda elektroporace se nejeví jako vhodná pro transfekci klíčtčích buněk (nebyl detekován žádný fluorescenční signál). S tímto tvrzením bych trochu polemizoval, neboť (jak sama píše v závěru) si není zcela jista funkčnosti připravených konstruktů.

Obr. 10 ukazuje colony PCR a uvádí použití 1kb DNA markeru, to ale neodpovídá. Jedná se pravděpodobně o 100bp DNA marker. Z obrázku je patrný band v NC pro actin. Ověřovali jste, zda signál u ostatních vzorků není díky kontaminaci?

U obr. 11 autorka uvádí, že velikost klonovaných fragmentů byla kontrolována pomocí agarózové elektroforézy. Toto je dle mého názoru nedostačující, neboť 1: chybí kontrola prázdného plazmidu a za 2: velikost actinového promotoru je jenom ca 70bp a to nebude na gelu patrné. Jak by autorka ověřila zda došlo k úspěšnému klonování?

Proč byla fluorescence po transfekci měřena jiným způsobem než v případě elektroporace? (plate reader vs mikroskop). To dle mého názoru to zhoršuje srovnání úspěšnosti jednotlivých metod.

Diskuze:

Diskuze je na 2 stranách a autorka v ní rozebírá získané výsledky s literaturou.

Dotazy a komentáře:

Autorka píše, že promotory CMV a SV40můžou být nevhodné pro klíčtčí buněčné linie. Oba promotory už ale v klíčtčích buňkách použity byly. Může mi to autorka komentovat?

Výsledky s klíčtčími promotory se liší od dříve publikované práce (Tuckow a kol 2015). Jak se liší sekvence promotorů z *I. scapularis* od sekvencí schodných promotorů z *R. microplus*?

Autorka píše, že transfekce pomocí polyjetu je účinnější než elektroporace. Podle čeho tak autorka usuzuje?

Závěrem bych chtěl říci, že navzdory všem mým otázkám a připomínkám předložená bakalářská práce Johany Mustacové **splňuje** veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU a tudíž ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 17.5.2018

Zdeněk Franta