

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Bc. Barbora Wengrynová**

Vedoucí/školitel/ka práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant/ka práce: Mgr. Diana Dimunová

Rok obhajoby: 2021

Oponent/ka práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Název práce:

Klonování a příprava plasmidu pro expresi UDP-glykosyltransferasy z vlasovky slezové

Rozsah práce: počet stran: 74, počet obrázků: 19, počet tabulek: 10, počet citací: 52

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: velmi dobrá
- c) Zpracování teoretické části: velmi dobré
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: výborná
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: Hemonchóza je parazitární onemocnění, které i v době moderních anthelmintik stále představuje závažný problém. Hlavním cílem diplomové práce byla příprava plasmidu kódujícího UDP-glykosyltransferasu (UGT) z vlasovky slezové a jeho následné využití pro expresi UGT v lidské buněčné linii. Jelikož se jedná o jeden z enzymů, které se podílí na vzniku rezistence vlasovky vůči léčivům, je téma diplomové práce vysoce aktuální. Práce je klasicky členěna na část teoretickou a experimentální. Teoretická část je přehledná, obsahuje řadu důležitých informací, vhodné by bylo ale zlepšit práci s citacemi, zavádění zkratků či práci s obrázky (viz. připomínky). Cíle práce jsou jasně definovány a autorce se je podařilo zcela splnit, což svědčí o jejích schopnostech osvojit si potřebné experimentální techniky a metody (klonování, práce s *E. coli*, práce s lidskou buněčnou linií, transfekce, technika DotBlot). Výsledky a diskuze jsou odděleny, přičemž diskuze obsahuje i nejnovější poznatky týkající se řešené problematiky.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

1) Citace jsou často uvedeny až na konci velké části textu, nikoliv za jednotlivými odstavci, což přináší řadu nejasností. V kapitole 2.2.2 a 2.2.4 citace zcela chybí (resp. v kapitole 2.2.2 citace chybí, v 2.2.4 jsou citace uvedeny až u předposledního a posledního odstavce a není tak jasné, odkud jednotlivé informace byly čerpány). Str. 18: „Geny pro UGT jsou z největší části polymorfní ...“) - také chybí citace. Citace chybí i u informací na str. 19. Dále chybí také v kapitole 2.8 (druhý a třetí odstavec) a v podkapitole 2.8.1 (citace je až v podkapitole 2.8.1.1).

- 2) V textu diplomové práce chybí odkazy na obr. 2–6.
- 3) V diplomové práci jsou uvedeny některé zkratky, jejichž význam je vysvětlen pouze v seznamu zkratk (např. FLU, NK).
- 4) Vhodné by bylo sjednotit psaní literárních zdrojů. Názvy odborných časopisů jsou někdy uvedeny celým názvem, jindy ve zkráceném tvaru (např. *Physiol Rev*). Většinou jsou psány kurzívou (ta chybí u názvu časopisu u citace Matoušková et al. 2016). Zvláštní je také používání vol. a no. ve spojení se zkratkou s. pro čísla stránek.
- 5) Str. 37: Bylo by vhodné uvést i přesné číslo protilátky, nikoliv pouze výrobce. DNA Gel stain a DNA stain G, o kterých se píše na str. 41, by také měly být uvedeny v kapitole 4.1 (Materiál). V seznamu je uveden SYBR Safe DNA Gel Stain. Ujasněte prosím používání těchto chemikálií v rámci jednotlivých experimentů.
- 6) Str. 44: Vhodné by bylo nahradit spojení „sterilní hokejkou“ odbornějším termínem.
- 7) Str. 45: „Reakci byla podrobena také ligační směs použitá k transfekci.“ Pravděpodobně by zde mělo být k transformaci (bakterií *E. coli*).
- 8) Str. 47: Je uvedeno, že k počítání buněk byla použita počítač komůrka. Bylo by vhodné dále upřesnit, zda k samotnému počítání byl použit mikroskop či jiný přístroj.
- 9) Str. 66: Mělo by být jednotně: SDR - dehydrogenasy/reduktasy (nikoliv dehydrogenasy/reduktázy) s krátkým řetězcem. U zkratk TAE a TBE je uveden stejný celý název (Tris-borát-EDTA).

Dotazy:

- 1) Co přesně znamenají zkratky ISE, WR a IRE? Vůči kterým léčivům (popř. kým) byla citlivost těchto kmenů testována?
- 2) Na straně 26 uvádíte, že plasmidy mají velikost 3–6 kbp a jsou schopné přijmout inzerť DNA dlouhý 10–15 kbp. Je tomu skutečně tak? Bylo by možné inzerť o takovéto velikosti zaklonavat i do plasmidu pCI, který používáte v diplomové práci?
- 3) Jsou LacZ a His-tag součástí plasmidu pCI? Co z toho vyplývá pro klonování?
- 4) V případě, že bychom izolovali rekombinantně připravený protein UGT, jakým způsobem by bylo možné z něj odštěpit His-tag?
- 5) Zkontrolujte prosím údaje uvedené v tabulce 2 (zejména celkový objem u MasterMixu). Skutečně jste pipetovala objem 125,125 µl?
- 6) V tabulce 6, u MasterMixu, by se pravděpodobně mělo jednat o 24 reakcí (nikoliv 23).
- 7) Na str. 50 je uvedeno, že ve sloupcích 1 a 3 jsou pruhy výš, než bylo očekáváno. Přesto byly vzorky použity pro další experimenty. Čím může být tento posun způsoben?

Celkové hodnocení, práce je: velmi dobrá, k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové dne 3. 9. 2021

.....
podpis oponentky / oponenta