

Téma diplomové práce	Klonování a exprese lidské karbonylreduktasy CR-1
Jméno studenta, studentky	Linda Laštovková
Jméno oponenta	PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

II. Posudek oponenta

Cílem diplomové práce Lindy Laštovkové byla příprava expresního vektoru pro získání rekombinantní lidské karbonylreduktasy 1 (CBR1). Úvodním krokem byla specifická amplifikace kódové sekvence CBR1 z plasmidu pOTB7 pomocí PCR. Dále byla úspěšně provedena ligace této sekvence do vektoru pCR 2.1. TOPO. Posledním záměrem byla subklonace kódové sekvence do expresního vektoru pET15b, kterou se však zatím nepodařilo dokončit.

Vlastnímu popisu experimentální práce předchází teoretická část, kde je uveden přehled biochemie redukčních enzymů. Následuje metodická část, zabývající se základními principy molekulárního klonování a exprese rekombinantních proteinů v *E. coli*.

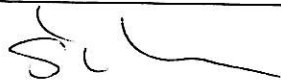
Po formální stránce má předložená práce velmi dobrou úroveň; je přehledná, napsaná jasným slohem a doložená kvalitní obrazovou dokumentací. To, že se ne všechny experimenty v omezeném časovém období nepodařilo dovést do konce, rozhodně nesnižuje zásadní přínos této práce coby důležitý krok k zavedení nových experimentálních metodik na katedře biochemických věd. Předloženou práci proto hodnotím velice pozitivně a mám pouze několik drobnějších poznámek, připomínek a dotazů:

- Pro Váš projekt jste amplifikovala kódovou sekvenci CBR1 z komerčně dostupného plasmidu pOTB7. Jaké jsou jiné možnosti získání kódové sekvence genů pro produkci rekombinantních proteinů?
- Na straně 53 uvádíte složení reakčního mixu pro PCR. Spíše než pipetované objemy zásobních roztoků by bylo vhodnější uvádět koncentrace těchto složek.
- Na straně 67 by bylo vhodnější uvést výtěžky, spíše než koncentrace vzorků vyizolované DNA.
- Pro lepší orientaci čtenáře by na fotografiích gelů bylo dobré uvést vedle žebříčku vždy alespoň některé molekulové hmotnosti výraznějších bandů, a to i přesto že ve všech experimentech byl použit pouze jeden typ žebříčku a tento je popsán na obr.3.

Závěr: I přes uvedené dílčí připomínky předložená práce zcela splňuje požadavky na diplomovou práci kladené a doporučuji ji proto k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace **výborně**

V Hradci Králové dne 26. května 2008


Podpis oponenta diplomové práce