

**Oponentský posudek bakalářské diplomové práce Veroniky Skladané
„Izolace genu pro antimikrobiální peptid (defensin) z tvrdého klíštěte *Ixodes ricinus* po
infekci spirochétami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi*“**

(vypracoval Petr Kopáček, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice).

Předkládaná bakalářská práce je sepsaná na 46-ti stranách včetně seznamu použité literatury. Úvodnímu literárnímu přehledu je věnováno 12 stran, metodická část je rozepsána na 13-ti stranách, výsledky jsou uvedeny na 6-ti stranách včetně 10-ti obrázků a jsou následovány 3-stránkovou diskuzí se závěrem. Z hlediska členění je práce v pořádku. Práce je sepsaná poměrně srozumitelně s přijatelným počtem tiskových chyb. Z formálních a pravopisných chyb samozřejmě nejvíce zaujme chyba v názvu na titulní straně, opakující se chyby ve shodě podmětu s přísudkem, nejednotnost názvosloví (např. agaróza-agarosa-agarosa, Tab. str 19).

Literární přehled je zaměřen oproti zadání (problematika metodických přístupů při studiu diferenciatně exprimovaných genů) na mnohokrát opakované téma klíště a borélie. Specifickou částí úvodu jsou odstavce věnované antimikrobiálním peptidům – zejména defensinům popsaných u klíšťat a některým aspektům klíštěcí imunity. Tady mě samozřejmě zamrzelo, že autorka zcela opominula zmínit výsledky naší laboratoře týkající se imunitních proteinů hemolymfy: lektinu Dorinu M a α 2-makroglobulinu, univerzálního inhibitoru proteáz. Závažnější opominutí pak byla ignorace existence lysozymu, který spolu s defensiny tvoří jednu z mála slušně charakterizovaných součástí střevní imunity klíšťáků. Na straně 10, autorka zmiňuje úlohu proteinu Salp 15 při slinami aktivovaném přenosu borélií, necituje však zásadní práci Ramamoorthi et al., Nature 2005).

K úvodní části už jen jednu poznámku: „fat body“ u bezobratlých se nepřekládá jako tělní tuk ale tukové těleso.

Metodická část, je podle mého názoru zbytečně napěchována vatou popisující principy běžných metod jako je PCR, purifikace plazmidové DNA nebo restrikční analýza (mimočodem v práci není uveden jediný výsledek restrikční analýzy izolovaných plazmidů). Naopak jsem postrádal restrikční mapy klonovacích míst použitých vektorů, výpočet velikosti očekávaného rekombinantního proteinu aj. Zkrátka jsem nezískal dojem, že studentka přesně ví proč, co a jak dělat a jaký výsledek lze očekávat.

Největší výhrady mám ke kapitole výsledky. Veronika Skladaná se sice v souladu s cíly práce (bod 2) seznámila s metodami RNA/DNA purifikace, cDNA syntézy, PCR, klonováním a sekvenováním), předložené výsledky však v žádném případě neumožňují tvrdit, že tyto metody skutečně zvládla na úrovni požadované od našich absolventů.

1. Obrázek 2 i bez použití markerů jednoznačně ukazuje, že izolovaná RNA byla degradovaná a nepoužitelná pro další práci. Obrázek 3 ukazující syntetizovanou cDNA to jen potvrzuje. (Nutno opakovat!).

2. Gel ukazující výsledky PCR amplifikace genu defensinu není podle studentky “pořádně rozjetý, protože byla elektroforéza vypnuta předčasně”. Toto bohužel není obhajitelné ani jako protokol z odpoledních praktických cvičení. Navíc se z toho “málo rozjetého” gelu zdá, že získané amplicony byly menší než produkt reakce s kontrolním plazmidem.

Vzhledem k uvedeným výhradám a otázkám mohu pouze doporučit bakalářskou diplomovou práci Veroniky Skladané k obhajobě před příslušnou komisí. Klasifikaci provedu až po předložení požadovaných souborů a podle kvality odpovědí na předložené otázky.

V Českých Budějovicích 23. 5. 2007



Petr Kopáček