



Přírodovědecká fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D. - Katedra molekulární biologie

tel. 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Posudek na bakalářskou práci: Expresce rekombinantního defensinu ze Zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) – autorka: Nikola Křížková (2010)

Cílem předložené bakalářské práce byla příprava rekombinantního peptidu Galiomicin ze zavíječe. Autorce se podařilo zaklonovat cDNA pro tento peptid do expresního vektoru a ověřit klon sekvencí.

Z formálního hlediska má sepsaná práce veškeré náležitosti i obvyklou strukturu, je pečlivě zpracována s minimem chyb gramatických i ve formátování. Celkový rozsah práce včetně pěti příloh je 51 stran.

Nejrozsáhlejší částí na 13 stranách je úvod, ve kterém autorka zevrubně popisuje imunitní systém hmyzu a pak poměrně detailně antimikrobiální peptidy. Je zřejmé, že autorka musela zpracovat poměrně velké množství vědecké literatury, kterou správně cituje. Podařilo se jí obsáhnout široké téma a zpracovat zásadní poznatky, potud tedy bylo dosaženo cíle bakalářské práce, tj. naučit se pracovat s vědeckou literaturou. Nicméně je z této práce ještě dosti znát, že se autorka musí naučit zpracovávat vědeckou literaturu více kriticky, ne pouhé sbírání informací. Na mnoha místech začíná velmi obecným a tudíž málo vypovídajícím konstatováním, které tak nerozvíjí zpracovávanou problematiku žádoucím směrem. Autorka si potřebuje lépe ujasnit, co chce danou částí sdělit. To je pochopitelně ta nejtěžší část pro kritické zpracování tématu a bakalářské práce jsou zpravidla prvním pokusem dosáhnout právě tohoto. Občas je také z vět poznat, že autorka plně nepochopila jejich smysl a prostě se je snažila nějak přeložit a použít, jako např. na str. 18 „Knotiny jsou atraktivní i ve výrobě léčiv, neboť jsou lehce přístupné a chemicky syntetické“ (věta takto nedává příliš smysl, i když si dovedu představit, co se asi originál snažil říci). Rád bych ovšem, aby tato kritika byla brána spíše jako upozornění na slabiny prvního pokusu o kritické zpracování vědeckého textu a poučení pro další podobné práce – „pokud si myslím, že je něco důležité, ale ne zcela tomu rozumím, obtěžuji svého školitele tak dlouho, doku mi to není jasné“. Celkově ale mohu konstatovat, že úvod této práce je dobrý.

Ostatní části jsou též pečlivě zpracovány včetně kvalitních obrázků a grafických příloh. Konkrétní připomínky a dotazy jsou uvedeny dále. Diskuze je kratší a má spíše formu závěrečného shrnutí toho, co bylo uděláno – typický problém mnoha bakalářských prací. Na obranu autorky bych ale měl zdůraznit, že předložená experimentální část není příliš komplikovaná a výsledky jsou jasné a tak není toho tolik k diskuzi. Možná by bylo dobré v diskuzi rozebrat, co dál se bude dělat se zaklonovaným konstruktem, jak přesně bude využit. Autorka pouze konstatuje, že bude sloužit jako pozitivní kontrola v dalších experimentech.

Připomínky:

1. str. 22 postup, bod 6. - nejedná se o PCR, ale o reverzní transkripci
2. str. 25 – při použití Pfx polymerázy kombinuje autorka teplotu polymerace 68°C a závěrečné polymerace 72°C, ta by měla být dle mého názoru stejná (68°C), protože je ideální pro tuto polymerázu. Obdobně je kombinuje i pro Taq polymerázu (tam by měla být 72°C).
3. str. 30, část 6.1 Syntéza cDNA popisuje nejen syntézu, ale ve zkratce celý postup, včetně PCR a sekvenace
4. str. 37 začíná nadpisem Seznam příloh, ten tam ale není a je tam rovnou příloha 1.
5. str. 37 pro tisk sekvence nukleotidů a pod tím aminokyselin je lépe použít font Courier, protože má stejné rozestupy pro každé písmeno a tudíž se nerozhodí pozice tripletů a příslušných aminokyselin.

Dotazy:

1. Str. 6 „U hmyzu je rezistence vůči patogenům způsobena především jeho velkou rozmanitostí a růstovými schopnostmi“ – tomuto konstatování nerozumím.
2. Str. 11 „Při nespecifických imunitních reakcích je odpověď rychlá a dlouhodobá.“ Skutečně dlouhodobá? Co tím autorka myslí?
3. Str. 13 „Výhody AMP jsou: selektivita, rychlé zabíjení, široké antimikrobiální spektrum ...“ Jak jdou v tomto případě dohromady selektivita a široké antimikrobiální spektrum, může to autorka lépe vysvětlit?
4. Str. 15 „tkáňová exprese AMP odráží jejich genovou strukturu“ – jakým způsobem?
5. Str. 20 – v sekci Materiál uvádí autorka mimo jiné Sekvence genu Galiomicin – co tím myslí?
6. Str. 21 – pro izolaci RNA byly preparovány „žlázy“ – které žlázy?
7. Str. 23 – proč autorka používá 0,5x TAE pufr místo 1x?
8. Str. 30 – jaký je rozdíl mezi dráhou 1 a 2 na obr. 1?
9. Str. 31 – Úprava cDNA – jak umožňuje sekvence CACC na 5-konci směrové klonování (není vysvětlen princip)?
10. Proč ověřovala autorka přítomnost genu zaklonováním do pGem-T Easy vektoru, jaký smysl měl tento krok? Zvláště pokud toto autorka uvádí až po zaklonování inzertu do expresního vektoru – toto zaklonování pro změnu není řádně zdokumentováno (tak jako pro pGem), pouze je to konstatováno a v příloze je sekvenace z tohoto vektoru svědčící o tom, že skutečně zaklonován byl.
11. str. 38-41 – oranžově jsou označeny vektory – co jsou černě označené sekvence?

Na závěr bych rád konstatoval, že předkládaná bakalářská práce Nikoly Křížkové splňuje kritéria, kladená na tento typ práce, a proto ji doporučuji k obhajobě. Hodnocení bude navrženo na základě prezentace a reakcí na dotazy.

V Českých Budějovicích 25.1. 2010

Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.