

# Oponentský posudek na bakalářskou diplomovou práci

Tereza Stašková: **Klonování a exprese části genu Ser-2 bource morušového.**

Oponent: Vladimír Košťál  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav a  
Jihočeská Univerzita v Č.B., Přírodovědecká fakulta

## Formální stránka:

Předkládaná práce má 51 stran a je správně členěna do obvyklých kapitol. Úprava textu i obrázků působí přehledně a účelně. Text je napsán stylisticky čistě a logicky, téměř bez pravopisných chyb a překlepů.

## Věcná stránka:

**Anglická anotace** tvrdí, že část genu Ser-2 byla klonována do expresního vektoru (to je pravda) a použita pro přípravu rekombinantního proteinu (to už pravda není, protože protein se připravit nepodařilo).

**Úvod** zabírá jednu stránku. Ačkoli je napsán poměrně dobře, jeho obsah poněkud splývá s obsahem následujícího Literárního přehledu. Patrně mohly být vynechány detaily o snovacích žlázách a podrobné struktuře hedvábného vlákna. Naopak posílena mohla být ta část, kde se vysvětluje širší rámec práce. Tedy objasnit PROČ právě sericin a proč právě *Ser-2*.

**Literární přehled** na zhruba 11 stranách je velmi pěknou částí práce. Stručně a přitom dostatečně podrobně jsou postupně představeny: historie hedvábnictví, bourec morušový, hedvábné vlákno, jeho komponenty a praktické využití.

Trochu mi opět chybí jasné zdůvodnění výběru genu *Ser-2* jako předmětu této práce. Proč právě tento gen a proč právě tato jeho část?

**Cíl práce** je samostatně formulován na straně 17 (příprava vektorů), ale také na konci Úvodu (strana 5, vytvoření rekombinantního proteinu). Je zřejmé, že původní cíl byl posléze zúžen, když došlo ke komplikacím. To nevadí, pouze by obě části textu měly být uvedeny do souladu.

**Materiál a Metodiky.** Tato kapitola je místy velmi podrobná a obsahuje spoustu detailů, ale místy je naopak velmi lakonická a pouze se odkazuje na protokoly výrobců použitých kitů (jako např. na str. 20, purifikace DNA z gelu, str. 24, izolace plazmidů). Nekritizují odkazování se na protokol výrobce (to je běžný postup), jen opět upozorňují na vyváženost textu (detaily u jedné metody vs. lakonický odkaz u jiné metody).

Mám několik drobných dotazů či připomínek, které by autorka mohla při obhajobě komentovat:

**1. Přehled použitých primerů** (str. 18): Primery jsou graficky zobrazeny také v přílohách, některé jsou v sekvenci plazmidů a jiné jsou genově specifické. Orientace je pro čtenáře obtížná. Příloha 8.3 na straně 42 například ukazuje žlutě dva genově specifické forward primery, které jsou oba na stejném místě, ale jeden z nich má na 5'-konci "přilepenou" sekvenci CACC. Proč, je to sekvence intronu? Dále ukazuje příloha 8.3 dva primery zeleně, z

nichž jeden, *Basha 5 R*, je uveden jako reverzní primer, ale je evidentně forward. Druhý, zelený primer jsem zase nenašel v seznamu na str. 18. Celkově mám tedy v primerech značný chaos a nemohu si tudíž ověřit velikosti amplikonů v jednotlivých PCR.

**2. Reverzní transkripce** (str. 19): Byla izolovaná celková RNA před reverzní transkripcí přečištěna pomocí DNázy? (Jestliže ne, mohlo by to vysvětlovat amplifikaci velmi dlouhých fragmentů z genomové DNA v následné PCR reakci). Proč byla použita relativně vysoká teplota polymerace (55°C) a naopak relativně nízká teplota inaktivace reverzní transkriptázy (72°C).

**3. PCR** (str. 20): Proč byla použita relativně nízká teplota pro nasedání genově specifických primerů (45°C) (pravděpodobně to vedlo k amplifikaci mnoha nespecifických produktů).

**4. Měření koncentrace dsDNA fluorimetrem** (str. 21): Chybí vysvětlení toho, co to je roztok A (H33258) a k čemu slouží.

**Výsledky** práce jsou uvedeny na zhruba 5 stranách. Na rozdíl od Literárního přehledu, četba této kapitoly vyžaduje větší soustředění, listování prací a domýšlení si různých souvislostí. Připomínky:

**5. Amplifikace části genu** (str. 30): Není zřejmé, jak dlouhé PCR produkty byly očekávány (díky nepřehlednosti primerů si to nelze ani odvodit). Teprve v Diskusi se mluví o inzertech o velikosti 797 a 897 párů bazí. Není zřejmé, který z obou produktů (tzv. "horní" a "spodní" pruh byl vyříznut a klonován, oba dva?).

**6. Obr. 4** (str. 31): Má ukazovat, dle popisku, produkt o velikosti asi 1000 párů bazí. Produkt je ale zřetelně kratší. Jeho skutečná délka je však těžko odhadnutelná, jelikož použitý DNA ladder: a) není příliš vhodný (v inkriminovaném rozsahu nenabízí dobré rozlišení, má jen proužky 750 a 1000 kb a mezi tím nic); b) není vidět (je nutné lepší foto).

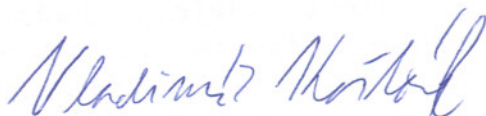
**7. Sekvenační analýza** (str. 33, str.): Zaklonované sekvence mohly být uvedeny ihned za textem (jako obrázek) a ne ukryty až v přílohách. Mohlo být provedeno jejich vzájemné porovnání pomocí vhodného softwaru (např. DNA Star, modul MegAlign), aby bylo zřejmé, že jsou si oba inzerty velmi podobné.

**Diskuse** je velmi stručná, na půl stránky. Celá práce byla však zaměřena převážně metodicky, takže stručnost lze pochopit. Přesto jsem plně neporozuměl vysvětlení, proč byl v prvním pokusu zaklonován jiný fragment než očekávaný. Pomohla by nějaká názorná mapa genu *Ser-2*, kde by byly vyznačeny introny a exony, repetitivní sekvence, primery a jiné strukturní elementy, o kterých se píše v práci.

#### Celkové zhodnocení:

Formální a literární část práce hodnotím výborně. Věcná část sice vykazuje řadu drobných nedostatků nebo místy spíše nejasností, ale ve druhém pokusu se podařilo zaklonovat kýženou část genu *Ser-2* do plazmidu a tedy splnit cíl práce. Přesvědčivým důkazem je získaná sekvence inzertované DNA. Studentka tedy prokázala schopnost zvládnout náročnou a komplexní metodiku práce s rekombinantní DNA. Doporučuji diplomovou práci hodnotit známkou **v ý b o r n á**.

V Českých Budějovicích  
dne 18. května 2009



Vladimír Košťál