

Oponentský posudek na bakalářskou práci Pavly Šedivé s názvem: Porovnání metod pro fixaci a přípravu vzorků tasemnic pro skenovací elektronovou mikroskopii

Předložená bakalářská práce je rozdělena do dvou částí. První část diplomové práce (24 stran) je literární přehled, který se vztahuje k zadané problematice. V druhé části autorka popisuje vliv fixačních činidel a dalších postupů přípravy vzorků na strukturu tasemnice *Senga sp.* v SEM (20 stran). Následují kapitoly závěr a přehled literatury.

Literární rešerše

Kapitola 3.2. (Princip SEM) je srozumitelná, dobře vystavěná a popisuje dostatečně základní informace o konstrukci SEM a principy. Kapitoly 3.2.3. až 3.2.7. jsou však z velké části postaveny na základních informacích pro studenty PřF JU, které byly pečlivě přepsány (nikoliv opsány!) ze skript Ing. J. Nebesářové (2001) určených pro studenty Elektronové mikroskopie, bakalářské práce Tomáše Bílého (PřF JU) z roku 2007 a kapitoly Skenovací elektronový mikroskop (SEM) ve službách biologie (Jurečka a Nebesářová, 2010). Autorka často cituje tyto učebnice na místo původních prací. Příklad ze str. 11: „Jejich detektor (pozn. detektor BSE) bývá umístěn na okraji pólových nástavců objektivové čočky, kde jeho účinnost záchytu přesahuje 50% (Nebesářová, 2001)“. V tomto souhrnu postrádám nové trendy např. 3D rekonstrukce, FIB, pokroky v detekčních systémech, korelativní mikroskopie, pozorování zavodněných a živých preparátů, výhody SEM pracujících při nízkých kV pro pozorování biologických (kryo) preparátů.

Podobně také kapitola 3.3, která shrnuje běžně využívané postupy při přípravě preparátů pro SEM, je z větší části převzata z velmi zdařilé internetové učebnice Ing. Jany Nebesářové z roku 2001. Autorka se věnuje důkladně chemické fixaci, přičemž např. použití akroleinu při fixaci je záležitostí spíše historickou, nicméně moderní fyzikální přístupy v přípravě materiálu nejsou dostatečně popsány a vysvětleny jejich výhody (viz připomínky).

Připomínky a dotazy:

Prosím o vysvětlení a opravu tvrzení ze strany 18: „Z experimentů je známo, že v buňce obsahující cca 80% vody dochází k zamrazení při teplotě -40°C . Rekrystalizační teplo je -85°C , krátí se tak čas, při kterém se mohou tvořit krystaly (Nebesářová, 2001).“

Prosím o doplnění informací k větě str. 19: „Vzorek je po zmrazení v tekutém dusíku přenesen do předkomory, kde může být vysušen mrazovou sublimací,.....)“

Autorka ve své experimentální části práce pravděpodobně použila způsob kryofixace v tříšti vytvořené z tekutého dusíku (slush), o kterém však nic neuvádí. Můžete prosím vysvětlit tento způsob fixace.

Na str. 15 je uvedeno: „Formaldehyd reaguje s tkání několika způsoby, včetně zasíťování proteinů, glykoproteinů, nukleových kyselin a polysacharidů (Hopwood a kol., 1989).“

Formaldehyd reaguje s tkání několika způsoby, včetně zasítování proteinů, glykoproteinů, nukleových kyselin a polysacharidů (Hopwood a kol., 1989). Prosím o mechanismus zasítování těchto buněčných komponent pomocí jedné funkční skupiny formaldehydu.

Uvádíte, že nevýhodou tekutého dusíku blízký bod tání (-210°C) a bod varu (-196°C). Můžete uvést proč?

Na straně 20 je uvedeno: „Preparáty, které prohlížíme ve vysokorozlišovacím SEM, nesmějí obsahovat vodu. Ta by se při vysokém vakuu explozivně uvolňovala.“ Lze tedy v tomto mikroskopu prohlížet kryofixovaný materiál a za jakých podmínek?

Experimentální část

Autorka použila 7 různých způsobů fixace tasemnic v kombinaci s použitím postfixace oxidem osmičelým. K sušení preparátů byly použity dvě různé metody (CPD a hexametyldisilazan) a byly pozorovány také kryofixované zavodněné preparáty. Na rozdíl od autorky nepovažují 2-20 min sublimaci ledu při -95°C za sušení preparátů. Pomocí FE-SEM je zdařile dokumentován vliv na strukturu skolexů a segmentů tasemnic. Dle autorky bylo nejlepších výsledků dosaženo pomocí tzv. horké fixáže.

Dotazy a připomínky:

V kapitole 4.2. (Fixace materiálu) nejsou informace o složení některých fixačních roztoků (pufry, pH, příp. teplotě a délce fixace).

Není správně popsán způsob přípravy vzorků pro prohlížení v kryorežimu. „Tasemnice byly uchyceny do speciálního nosiče lepidlem a zmrazeny v tekutém dusíku o teplotě -135°C .“ (str. 33)

Prosím o vysvětlení: „Možné zlepšení (pozn. sublimace) by mohlo nastat při výměně sublimovaného media za těkavější.“ (str. 48)

Lze nějak vysvětlit proč jinak nejčastěji užívané fixační činidlo glutaraldehyd v kombinaci s OsO_4 není vhodnou fixací právě u tasemnic.

Celkově hodnotím diplomovou práci kladně. Oba cíle, které si Pavla Šedivá ve své bakalářské práci určila, byly splněny. Stylistická úroveň diplomové práce je výborná. Bakalářská diplomová práce splňuje požadavky kladené na tento typ prací a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 19.1. 2012

RNDr. Marie Vancová, Ph.D.

