

## Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Tomáše Krůčka na téma „Studium sericinu 3 u *Bombyx mori* a zaklonování sericinu do *Escherichia coli*“

(vypracoval Petr Kopáček, Parazitologický ústav, BC AVČR)

Tomáš Krůček předkládá k obhajobě poměrně rozsáhlou diplomovou práci, která je sepsaná celkem na 67 stranách včetně citací a příloh. Po formální stránce má práce všechny náležitosti a je standardně rozdělena do obvyklých kapitol.

Cílem práce bylo připravit rekombinantní fragmenty z repetitivních úseků sericinu 3 a pokusit se o prozkoumání jejich možné aplikace jako komponenty pro tkáňové kultury.

Úvod a literární přehled je sepsaný na celkem 16 stranách a předkládá historický přehled o původu hedvábí, životnímu cyklu a fyziologii bource morušového a zmiňuje i další živočichy produkujících hedvábí. Dále se autor podrobně věnuje jednotlivým proteinovým složkám hedvábí a končí výčtem možných praktických aplikací sericinů, které jsou získávány ve velkém množství jako odpadní produkt při výrobě hedvábí.

Musím říct, že z literárního přehledu mám poněkud rozpačitý dojem. První část je psána víceméně populárně-vědeckou formou, druhá část popisující vlastnosti proteinů hedvábí a jejich genů naopak má rysy hodně kondenzovaného a místy dost nemotorně přeloženého review. Obsahuje téměř nespočetné množství citací (já jich napočítal kolem 170). Mnohé literární odkazy pocházejí z velice exotických časopisů včetně japonské patentové literatury, takže je více než zřejmé, že autor čerpal z nějakého druhotného zdroje. Osobně si cením daleko víc, když student uvede daleko skromnější seznam použité literatury, ale z napsaného textu je poznat, že tyto zdroje skutečně četl a je schopen je interpretovat vlastními slovy. Úplnost a správnost citací jsem kontroloval jen namátkou, nějaké chyby jsem našel. V úvodu práce jsem zcela postrádal kapitolu, která by blíže vysvětlila, proč se autor zabýval právě sericinem 3 a vybranými segmenty. Obrázek 16 – schéma sericinu 3 s patřičným vysvětlením by mělo být součástí úvodu.

K úvodní části mám tyto dotazy:

- Na straně 8 píšete o genu pro H fibroin o oblastech A až E, aniž by bylo vysvětleno, co tyto oblasti znamenají – Můžete to blíže vysvětlit?
- V odstavci 1.6.3.2. zmiňujete dva inhibitory serinových proteáz (Kunitzova a Kazalova typu). Je známo něco o specificitě těchto inhibitorů vůči serinovým proteázám?
- Na straně 11 jsem objevil pojmy jako alkyláza a alkalinní proteázy. Podobně na straně 13 jsou zmíněny látky jako pluronik nebo karbopol. Můžete tyto pojmy blíže vysvětlit?

Metodická část je popsána víceméně heslovitě pomocí krokových postupů inspirovaných z manuálů za použití laboratorního žargonu (zvortexovat, klávkovat, glycerol stok apod.)

Jako templát pro amplifikaci fragmentů genu sericinu 3 autor použil cDNA ze snovacích žláz housenek posledního instaru. K metodice mám několik drobných poznámek a dotazů:

- Při izolaci RNA zmiňujete, ošetření pomůcek proti RNAázám – Jak a čím?
- Na stránce 21 chybí odkaz na sekvence použitých primerů, které jsou uvedeny až v příloze.
- V odstavci 3.3.5 Elektroforéza vzorků z PCR – krok 4 je mylně uvedeno, že byla nanášena RNA.
- Z jakého důvodu jste zvolili expresní vektor pET 151?
- Při SDS-PAGE elektroforéze se používá termínů separační a zaostřující gel nikoli základní a krycí gel. Jaký je mezi těmito gely rozdíl a proč?
- Při popisu Western blotu uvádíte, že jste membrány barvil na vizualizaci proteinů pomocí Ponceau S až jako poslední krok po chemiluminiscenčním vyvolání blotu. To je trochu podivné, neboť membrána byla již před tím vysycená v mléce a inkubována s protilátkami. Byl jste skutečně schopen proteiny takto detekovat?
- Popište blíže Ni-NTA purifikační kit – jaká je jeho kapacita s ohledem na množství rekombinantního proteinu, který lze zachytit?

- Píšete cosi o vzorcích přečištěných pomocí přístroje Alpha 1-2 LD plus Christ. Co je to za přístroj a na jakém principu funguje?

Navzdory tomu, že výsledkem většiny PCR amplifikací byly rozmazané stopy DNA, Tomášovi se podařilo zaklonovat celkem 5 různě dlouhých produktů od cca 260 do cca 670 bp.

Aminokyselinová sekvence těchto produktů je ukázána na pěkném obrázku 17.

Po zaklonování amplifikovaných fragmentů do expresního vektoru byly transformovány expresní buňky (Z jakého důvodu jste použili buňky Rosetta?) a provedeny pilotní exprese, kdy rekombinatní fragmenty byly detekovány na Western blotech pomocí protilátky proti polyhistidinovému motivu. Tyto westerny ukazovaly na celkem úspěšnou expresi víceméně nezávislou na indukci IPTG.

Oproti tomu proteinový profil získaných buněčných extraktů nenaznačoval výraznou expresi rekombinatních fragmentů a proto i snaha o jejich purifikaci pomocí Ni-NTA kitu vedla jen k malým výtěžkům.

- Při expresi jste se zaměřil jen na solubilní cytoplazmatickou frakci. Z jakého důvodu? Ověřoval jste, zdali vaše proteiny nejsou v daleko větší míře přítomny v inkluzních tělískách? Jakou purifikaci byste zvolil v takovém případě?
- Jaké přečištění proteinů jste si slibovali od dialyzačního kroku?
- V legendě k obr. 28 a 29 uvádíte u proteinového markeru údaj 1 kbp.
- Jakou metodou byste byl schopen identifikovat, zda získaný band na gelu skutečně odpovídá očekávanému rekombinatnímu proteinu ?

První odstavec v kapitole diskuse popisuje důvod pokusu. Jak jsem předeslal, tento odstavec měl být posledním odstavcem úvodní části. V dalších diskusních odstavcích autor víceméně komentuje problémy spojené s jednotlivými metodami a získanými výsledky. Myslím, že by práci prospělo, kdyby diskuse byla spojena s výsledky do jedné kapitoly.

Závěrem svého hodnocení bych chtěl vyzdvihnout, že se Tomáš Krůček během své diplomové práce vyučil základním metodám molekulární biologie a práci sepsal poměrně kvalitně, třebaže se nevyhnul překlepům a drobným chybám.

Magisterská diplomová práce Tomáše Krůčka určitě splňuje kritéria Přírodovědecké fakulty JU pro získání magisterského titulu a doporučuji ji k obhajobě před příslušnou komisí.

Práci samotnou hodnotím jako velmi dobrou.

V Českých Budějovicích, 16. května 2011



Petr Kopáček



**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

---

### **Oponentský posudek na magisterskou práci Tomáše Krůčka**

Tomáš Krůček vypracoval svou magisterskou práci s názvem "Studium sericinu 3 u *Bombyx mori* a zaklonování sericinu do *Escherichia coli*" pod vedením Roberta Fediče v laboratoři prof. Sehnala. Cílem jeho práce bylo zaklonovat z cDNA určité části genu Sericin 3 a pomocí těchto klonů produkovat příslušné rekombinantní peptidy. Sericiny se využívají jako přísady do médií pro tkáňové kultury, ale neví se, která část proteinu je zodpovědná za sledované účinky. Z tohoto pohledu se jedná o práci, která by mohla mít velmi významný přínos v oblasti pěstování buněčných kultur. Výroba rekombinantních proteinů je skoro vždy spojena s mnoha úskalími, proto bych hned na začátku velmi ocenil, že se Tomášovi podařilo vyprodukovat všechny zamýšlené peptidy.

Samotná práce je sepsána na 60 stranách + přílohy a splňuje všechna formální kritéria magisterské práce. Práce je dobře členěna, je přehledná s kvalitními obrázky a celkové zpracování působí velmi dobrým dojmem. Jsou v ní všechny podstatné části, které v sobě mají veškeré potřebné informace tak, jak je v těchto pracích zvykem.

Úvod, ač pěkně sepsaný se spoustou velmi zajímavých informací o bourci a všech možných informací o hedvábí (včetně historie), je bohužel zbytečně rozsáhlý a z větší části není k věci. Autor by si měl dávat pozor na zacílení úvodu na informace potřebné k samotné experimentální práci a neseepisovat encyklopedie, i když se mi to říká trochu s těžkým srdcem – Tomáš si dal určitě dost práce dát úvod dohromady.

Bohužel dále mé nadšení z práce výrazně pokleslo. Je to především obrovským množstvím chyb na každé stránce – překlepy, gramatické chyby, ale bohužel často i nejasné formulace a faktické chyby. Nebudu na ně zde do detailu upozorňovat, je jich hodně. Vždy jsem tuto kritiku považoval trochu za druhořadou, zvláště když se jednalo o jinak dobrou práci, ale musím konstatovat, že to opravdu zbytečně, ale přitom výrazně kazí dojem z práce a je třeba si na to dávat pozor. Bohužel je z několika málo pasáží poměrně zřejmé i to, že autor plně nepochopil metodiku či experiment, který popisuje, nebo ho prostě špatně popsal – viz. některé mé dotazy na autora v závěru k objasnění.

Trochu nepochopitelné pro mě bylo začlenění části „5.1. Důvod pokusu“ až do závěrečné diskuze. To je poněkud pozdě, čtenář skoro do konce práce tápe, proč jsou vlastně popisované experimenty prováděny. Tahle stať to konečně krásně ozřejmí. Magisterská práce není thriller, aby vyžadovala takový scénář.

Připomínky:

Str. 20 – poslední odstavec: „*Aby bylo možné **B**udoucí produkty zaklonovat do expresního vektoru, potřebného pro vnesení produktu do plasmidu, bylo potřeba, aby produkty měli tupé konce.*“ ... tato věta nedává příliš smysl, určitě se jedná o překlep a nedodělání opravy.

Str. 22 – 3.3.6. *Gelová extrakce - Pod UV byl gel vyříznut (co nejrychleji, aby nedošlo k poškození DNA) ostrou žiletkou.* Výše je uvedeno, že gel byl barven SYBR Safe – mohli jste využít modré světlo, které nepoškozuje DNA, namísto UV, měli by jste klid na vyřezávání.

Dotazy:

1. Str. 19 - po stati „*Měření koncentrace RNA na spektrofotometru*“ následuje stat' 3.3.2.2. „*Měření koncentrace RNA na gelu*“. Jakým způsobem se měří koncentrace RNA na gelu?
2. Str. 22. – 3.3.5. *Elektroforéza vzorků PCR, bod 4. Vzorky (RNA) nanесeny na gel ...* skutečně se jedná o vzorky RNA?
3. Str. 23 – „*Aby bylo možné PCR produkty zaligovat do vektoru, bylo nutné použít na izolaci DNA primery s přesahy CACC na 5' konec.*“ Zde je několik věcí k vysvětlení: jak se používají primery na izolaci DNA pro ligaci? Primer je jednovláknová DNA - kde má přesah CACC? Jak přesně je sekvence CACC využita pro směrové zaklonování do vektoru?
4. Str. 24 - 3.3.8.1. *Příprava Petriho misek se živným agarem – „Takto připravený roztok byl po částečném zchlazení vyklávan a smíchán s antibiotiky“ ...* skutečně byl vyklávan po zchlazení a pak přidány antibiotika?
5. Str. 32 - 4.1 *Získání RNA a cDNA - RNA byla vyizolována ze snovacích žláz posledního larválního instaru bource morušového a následně pomocí reverzní transkripce přeložena do cDNA. Kontrola byla provedena na agarózovém gelu (1,25%) a na spektrofotometru. Ve výsledném roztoku byla RNA v koncentraci A...* zde se míchá izolace RNA a reverzní transkripce – kontrola a určení koncentrace se týkalo RNA nebo cDNA? Na gelu jsou vidět dva proužky o velikosti 1000 a 7000 bp – pokud se mluví o RNA, pak ta velikost nebude sedět, protože je použit DNA marker (též mluvit u RNA o bp - base pair – nedává v tomto případě smysl – pozor na DNA vs. RNA v celém tomto odstavci a obrázku). Co by mohl být ten delší proužek?
6. Str. 34 – „*Úseky byly vyizolovány rovnou pomocí Pfx polymerázy a tak odpadl krok reamplifikace.*“ – jak se úseky „izolují“ pomocí Pfx polymerázy?

Mám-li to shrnout: ne příliš jednoduché experimenty úspěšně dovedené do konce, přehledně sepsáno do práce, jež splňuje všechna formální kritéria. Proto doporučuji práci k obhajobě. Celkový příznivý dojem kazí množství drobných chyb a někdy nepřesných formulací.

Tomáš Doležal, České Budějovice, 12.5.2011