

Posudek diplomové práce

Bc. Kláry Kolářové

„Purifikace viru mozaiky jetele bílého (White Clover Mosaic Virus) s následnou přípravou antiséra a izolací IgG pro sérologickou detekci viru pomocí ELISA“,

vypracované na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a oddělení Virologie, Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologického centra Akademie věd ČR, v Č. Budějovicích.

Cíl práce je patrný z názvu práce. Diplomantka použila 4 různé metody purifikace viru. Jedna z metod vedla k získání dostatečného výtěžku čistého izolovaného viru. Po imunizaci králíků se jí podařilo připravit kvalitní specifické antisérum proti viru. Po stanovení titru protilátek izolovala IgG a po jejich konjugaci s alkalickou fosfatázou stanovila optimální ředění IgG a konjugátu pro ELISA. Množství náročných experimentů svědčí o tom, že pracovala mimořádně pilně a s velkým zaujetím. Vzhledem k tomu, že protilátky mají vyšší kvalitu než komerčně dostupné protilátky od Deutsche Sammlung von Mikroorganismen v Braunschweigu v Německu, není pochyb o tom, že plánovaných cílů diplomové práce bylo dosaženo. Doporučuji protilátky nabídnout např. firmě Bioreba AG ve Švýcarsku pro jejich celosvětovou distribuci. Na pozitivním výsledku se jistě projevilo i zodpovědné vedení diplomantky ze strany školitelky Dr. Fránové a skutečnost, že téma bylo součástí řešení grantu NAZV QH71145, z něhož byla podstatná část práce financována.

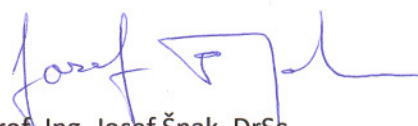
Autorka se během velmi náročné práce detailně seznámila s celým procesem přípravy protilátek proti rostlinným virům, které i nadále zůstávají základem komerční imunodiagnostiky virů při získávání viruprosté sadby a osiv. Zvládla celou řadu základních a pokročilých laboratorních metod rostlinné virologie a elektronové mikroskopie.

Práce má celkem 49 stran, je napsána pěknou češtinou a je přehledně členěna do jednotlivých kapitol s výbornou grafickou úpravou. Výborně a přehledně je zpracován teoretický úvod práce, včetně nejnovějších poznatků o molekulární biologii viru v rostlinných buňkách. Popis použitých metod je přesný a detailní. Výsledky jsou vhodně doplněny precizně zpracovanými tabulkami, grafy a fotografiemi, zdroje informací jsou řádně citovány. Velmi pěkná je diskuze práce a z ní vyvozené závěry. V příloze práce jsou uvedeny 2 abstrakty příspěvků, které budou prezentovány na 4th Conference of the International Working Group of Legume and Vegetable Viruses v květnu 2011 ve Španělsku.

Zásadní připomínky k práci nemám. Nalezl jsem jen drobnou gramatickou chybu na str. 6 (byli objeveny), a překlep na str. 40 (byly tetovány/testovány) a v popisech tabulek 8 a 9 na straně 38, kde je v nadpisu uvedeno ředění vzorku 1:10-1:100000, zatímco v tabulkách jsou uvedena max. ředění 1:1000. To však nemění nic na tom, že se jedná o vynikající diplomovou práci, navíc s možným aplikovaným výstupem.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem hodnotím diplomovou práci - V ý b o r n ě -.

V Č. Budějovicích 12.5.2011



Prof. Ing. Josef Špak, DrSc.

Posudek na diplomovou práci Bc. Kláry Kolářové Purifikace viru mozaiky jetele bílého (white clover mosaic virus) s následnou přípravou antiséra a izolací IgG pro sérologickou detekci viru pomocí ELISA

Diplomová práce je velmi pečlivě zpracována, obsahuje všechny požadované části a plně odpovídá rozsahu těchto prací. Kapitola Úvod dostatečně uvádí čtenáře do studované problematiky. Cíle práce jsou stanoveny stručně, ale jasně. V kapitole Literární přehled je popsáno podle recentních publikací zařazení studovaného viru do systému, podrobně jsou také uvedeny strategie rozmnožování tohoto a příbuzných virů. Velmi významnou součástí tvoří podkapitoly týkající se tvorby protilátek a principu ELISA testu.

V části Materiál a metody je hlavní pozornost věnována popisu čtyř srovnávaných purifikačních metod a následné hustotní gradientové centrifugaci. Výběr správného purifikačního postupu je totiž nezbytný pro dostatečný výtěžek virových patogenů. Podrobně jsou také popsány metody purifikace králíka, imunodifuzního (Outerchlonyho) testu v agaru, izolace IgG a jejich následné konjugace s alkalickou fosfatázou. Následně byly optimalizována detekce WCMV pomocí ELISA testu. V této podkapitole nebylo podle mého názoru nutné uvádět konkrétní složení pufrů, neboť to je všeobecně známo.

Jako nejlepší vhodná metoda získání čistého viru byla vyhodnocena purifikace s použitím diethyletheru a tetrachlormethanu. Nejdůležitější a velmi cenným výsledkem je získání ELISA kitu pro detekci WCMV. Jako vhodné podmínky detekce touto metodou byly doporučeny použití IgG o koncentraci 1,5 µg/ml IgG-AP ředěné v poměru 1:1000 za inkubace substrátu 30 minut při pokojové teplotě. Optimalizovaný postup DAS-ELISA testu byl porovnán s komerčně dostupným kitem firmy DSMZ (Německo) a bylo prokázáno, že je vhodnější jak z hlediska pozadí reakcí, tak vyšších hodnot absorbance. Vzhledem k této skutečnosti mám dotaz, zda se počítá s komercializací tohoto produktu? Získané výsledky jsou následně vhodně diskutovány a stručně a výstižně uvedeny v závěru. K práci nemám závažnější připomínky, je s podivem, že ačkoliv se týká velmi specializované problematiky, je poměrně čtivá. Pouze v ojedinělých případech nebyla překontrolována shoda přísudku s podmětem – např. na straně 6 „kde byli objeveny sekvence“, str. 40 „Byli hodnoty absorbance“ apod. Zcela určitě se jednalo o prstovou chybu během psaní a následné nepozornosti při kontrole textu.

Doporučuji diplomovou práci přijmout a klasifikovat známkou A

V Brně 19.5.2011

Doc. Ing. Radovan Pokorný
Mendelova univerzita v Brně