

Posudek na diplomovou práci

Detekce vybraných rostlinných virů mikročipy (microarrays)

Diplomant: Bc. Lenka Hrabáková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.
ÚMBR BC AVČR, v.v.i.

Posudek vypracoval : Tomáš Moravec, PhD
Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 313, Praha 6
165 02

Cíle práce

Práce má deklarovanány 4 cíle a to:

1. Detekci 4 virů z ovocných dřevin pomocí RT - PCR (ApMV, PNRSV, PPV, PDV).
2. Návrh primerů a optimalizaci RT-PCR pro přípravu značených amplikonů pro použití na mikročipech.
3. Detekci PCR amplikonů na mikročipu.
4. Analýzu získaných fragmentů a návrh nových vhodnějších kotev

Struktura (členění) práce

Práce je členěna klasickým způsobem na literární přehled (15 stránek), Materiál a metodiku (6 stránek), vlastní výsledky (6 stránek), Diskusi a závěr (4 a 1 stránka) a seznam použité literatury (8 stránek). K práci jsou ještě přiloženy 4 přílohy o celkovém rozsahu 3 stránek. Rozsahem tak práce plně odpovídá nárokům kladeným na diplomovou práci.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Práce je strukturována poměrně logicky a přehledně. Jak již to u diplomových prací bývá, autorka se nevyhnula některým překlepům, jejichž částečný výčet je uveden níže. Ty však nijak nesnižují úroveň předkládané práce.

Literární přehled

V literárním přehledu autorka poměrně přehledně a logicky seznamuje čtenáře s vlastnostmi jednotlivých studovaných virových patogenů a s problematikou detekce rostlinných virů na mikročipech.

Experimentální část:

Experimentální část popisuje problémy, se kterými se autorka potýkala při detekci virů dřevin na mikročipu. Autorce se podařilo optimalizovat podmínky PCR reakcí pro amplifikaci vybraných segmentů genomu a dále pak podmínky přípravy značených amplikonů pro hybridizaci na čipu.

Diskuze a závěry :

Přes problémy spojené s multiplexovou amplifikací virových sekvencí a s nespecifitou hybridizace na čipu, se autorce podařilo dosáhnout cílů diplomové práce. Pomocí komerčního kitu iScript cDNA Synthesis Kit byly přepsány virové RNA do cDNA (ApMV, PNRSV, PDV a PPV). Na základě těchto cDNA byly poté získány Cy3 značené specifické fragmenty DNA. Dále byly navrženy nové primery amplifikující kratší úseky genomu, čímž se podařilo zvýšit robustnost celého postupu. Bohužel se nepodařilo optimalizovat PCR reakci pro simultánní amplifikaci všech čtyř patogenů v jedné reakci.

Značené DNA fragmenty byly poté specificky detekovány na mikročipu a byly optimalizovány podmínky hybridizace. Během hybridizace vzorků obsahujících více virů bylo zaznamenáno synergické anomální chování virů PSDV a PNRSV. Na základě získaných výsledků byly navrženy nové kotvy pro příští generace detekčních mikročipů.

Závěry jsou formulovány srozumitelně a výstižně a jsou podloženy výsledky práce

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle předložené diplomové práce považuji za splněné. Svým rozsahem a náplní odpovídá nároků kladeným na diplomovou práci. Proto předkládanou práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Nejprve předkládám seznam drobných opomenutí v textu

1. - prune **harf** virus (místo dwarf) v anglickém abstraktu
2.jako jediný z vybraných virů **není** PPV **nepřenášen** semeny... (strana 2) znamená to , že PPV je přenášen nebo není ?
3. ...K přichycení se používá mechanické pokovování (mechanical deposition)... v případě oligonukleotidové kotvy se mi výraz pokovování nezdá příliš vhodný (strana 11).
4. ...U obou výše zmíněných typů mikročipů jsou kotvy mikročipu **připravovány syntetizovány** in situ. .. (strana 13)
5. .. Vzorek byl opět umístěn na rotátor po dobu 30 minut za stejných podmínek - centrifugován 15 000 rpm, 15 minut při 4°C. Následně byl vzorek opět centrifugován 15 000 rpm 2 minuty, přidat 1% STE a etanol do výsledné koncentrace 16%, tento krok byl 5 krát opakován..... není zcela zřejmé, ve kterých krocích pracovala dále autorka s peletou a ve kterých se supernatantem (strana 18)
6. ... Po izolaci RNA z jednotlivých vzorků byla cDNA **připravována** reverzní transkripcí... strana 20
7. Na straně 24 bych uvítal i popis dalších velikostí použitého markeru , nejenom velikost očekávaného bandu.

8. Na obrázku 11 není z popisu zřejmé, zda se jedná o použití specifických nebo univerzálních primerů.

Dále prosím studentku o zodpovězení následujících otázek:

1. v textu na straně 4 uvádí autorka ... Dosud nebyl zaznamenán případ, ve kterém by docházelo k směsné infekci různými kmeny (Polák & Komínek, 2009). .. Jak si vysvětlujete vznik rekombinantního izobátu Rec, pokud je směsná infekce takto nezvyklým jevem. (strana 4).

2. V metodice v oddílu 3.2.2 popisuje autorka izolaci dsRNA. Jak správně uvádí, dsRNA je replikačním intermediátem vznikajícím v průběhu replikace RNA virů, který se většinou v infikované buňce vyskytuje v řádově menší koncentraci než genomová RNA. . Zajímalo by mne, zda bylo nějakým způsobem ověřováno, zda jde opravdu o dsRNA nebo zda je vyšší stabilita RNA způsobena například zabalením do virových částic.

3.- Na straně 21 uvádí autorka, že ... Takto získaná cDNA vzorků byla pro další testování uložena v chladničce.... Opravdu je cDNA natolik stabilní, že je možné ji dlouhodobě uchovávat v chladničce?

V Praze dne 8/1/2014



Posudek na diplomovou práci Bc. Lenky Hrabákové „ Detekce vybraných rostlinných virů mikročipy (microarrays)“.

Virové patogeny jsou závažnými původci chorob ovocných dřevin. Základním prostředkem ochrany vůči nim je pěstování zdravého sadbového materiálu. K jeho produkci a certifikaci jsou nezbytné reliabilní diagnostické postupy, které by měly splnit požadavky na přesnost a také na expeditivnost. Jedním z nově vyvíjených metod detekce virových a dalších patogenů, např. fytoplazem, je používání tzv. mikročipů. Z tohoto důvodu považuji předloženou diplomovou práci za aktuální a také případně přínosnou pro pěstitelskou praxi. Autorka se zaměřila na čtyři významné druhy virů: Plum pox virus, Apple mosaic virus, Prunus necrotic ringspot virus a Prune dwarf virus.

Diplomová práce zachovává strukturu běžnou pro tento typ publikací, pouze bych doporučil oddělení části Úvodu od vlastního literárního přehledu. Z rešerše je nicméně jasné, že podle uvedených počtů publikací a logického řazení jednotlivých podkapitol autorka prokázala schopnost pracovat s vědeckou literaturou. Přesto se v ní vyskytuje několik drobných nepřesností, neobratných formulací, pravopisných chyb apod. Na str.1 je zřejmé nadměrné používání slova „těchto“, na str. 7 „přenašeči nejsou známy“. Z terminologického hlediska je třeba zmínit, že podle nového českého názvosloví chorob je tradiční název šarka švestky (peckovin) změněn na virové neštovice (Kůdela et al., 2012). U obrázku 1 na str. 2 nejsou vysvětleny zkratky jednotlivých proteinů u PPV a nejsou ani uvedeny v seznamu na konci DP. Na str. 10 je nesprávně uvedeno spojení „detekce infekčních chorob“, neboť nejsou detekovány choroby, ale patogeny, které tyto choroby způsobují.

V kapitole Materiál a metody jsou uvedeny hlavní postupy, které byly použity při řešení této diplomové práce. Oceňuji, že autorka u metod, které již byly publikovány, nebo se jednalo o postupy uvedené v manuálech výrobců různých chemikálií, neuváděla přesné opisy, ale omezila se pouze na citace. Na str. 17 jsou nesprávně používány názvy ovocných druhů – hrušky (hrušně), broskve (broskvoně).

Výsledky jsou uvedeny v příslušné kapitole a často jsou doplněny fotografiemi nebo nákresey. Autorce se podařilo zdokonalit již dříve zavedenou metodu detekce pomocí RT-PCR zavedením nových virově specifických primerů. Byly provedeny pokusy o detekci více virových patogenů najednou, nicméně nejvyšší počet druhů virů, které se podařilo detekovat v jedné reakci, byly dva. Jakým způsobem byly připravovány vzorky pro detekci virů ze směsi? Při detekci virů na mikročipech autorka doporučuje prosloužení doby hybridizace ze 45 min na 16 hodin. Nezjistila žádné rozdíly mezi použitím ssRNA a dsRNA pro vlastní hybridizaci,

navrhla také nové kotvy, které budou dále testovány. Výsledky jsou dále diskutovány v příslušné kapitole. Jsou kriticky porovnávány s publikacemi autorů, kteří se zabývali podobnými postupy. V diskusi jsou také uvedeny problémy, které se vyskytovaly v průběhu práce a jsou často naznačeny postupy, které by jim mohli zabránit. Na str. 32 je uvedeno „Ilarviry i PPV jsou navíc detekovatelné jen v úzkém časovém rozmezí“. Co je tím míněno? Také formulace „je nezbytné pracovat s naprosto spolehlivě infikovaným materiálem“ je poněkud nešťastná, neboť cílem každé detekční metody je spolehlivě identifikovat patogena v rostlinném materiálu i při velmi nízké koncentraci. Kapitola Závěr stručně shrnuje dosažené výsledky, včetně některých problémů spojených s detekcí virů v ovocných dřevinách testovanými postupy. Jaké jsou plánované možnosti využití těchto vyvíjených mikročipů?

Závěrem lze konstatovat, že diplomantka prokázala schopnost vědecky pracovat z hlediska práce s literaturou, plánování a provádění experimentů, zpracování a vyhodnocení získaných výsledků. Uvedené připomínky mají spíše doplňující a doporučující charakter.

Diplomovou práci hodnotím klasifikací velmi dobře plus – B.

V Brně 17.1.2014

Prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.



Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce:

Bc. Lenka Hrabáková

Název práce:

Detekce vybraných rostlinných virů mikročipy (microarrays)

Předložená diplomová práce zpracovává na 48 stranách velmi zajímavou problematiku zabývající se detekcí vybraných rostlinných virů mikročipy. Práce je standardně členěná, po úvodní části zahrnující popis jednotlivých studovaných virů a detailní popis možnosti použití metody mikročipů jsou uvedeny cíle práce, které zahrnují:

- RT - PCR detekci virů z ovocných dřevin (ApMV, PNRSV, PPV, PDV) včetně ověření infekcí sekvenováním produktů;
- návrh primerů a optimalizace RT – PCR pro přípravu značených amplikonů v 1 kroku pro použití u mikročipů;
- detekci amplikonů na mikročipu;
- analýzu získaných fragmentů a návrh nových, univerzálněji použitelných kotev.

V části Materiál a metody se autorka podrobně zabývá popisem použitého rostlinného materiálu, postupů izolace RNA, použitých primerů, postupu reverzní transkripce, PCR reakce, elektroforézy DNA, sekvenování a hybridizací na mikročip.

Vlastní výsledky jsou soustředěny na RT PCR detekci jednotlivých virů, detekci amplionů na mikročipu, na hodnocení specifity mikročipu a návrh nových kotev. Jednotlivé úseky jsou podrobně charakterizovány a zhodnoceny nejen slovně, ale i zdařilou obrázkovou dokumentací. V diskuzi jsou zevrubně probrány všechny závažné okolnosti jednotlivých úseků, se kterými se autorka setkala ve vlastní práci a tyto jsou konfrontovány s příslušnými literárními údaji. Výsledky vlastní práce jsou autorkou stručně a výstižně shrnuty do závěru.

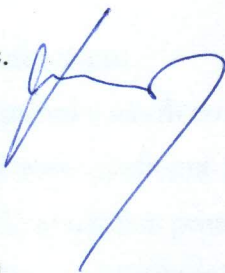
Výsledky jsou doplněny zdařilými obrázky (celkem 22) a v přehledu použité literatury je uvedeno 75 citací. Vlastní práci doplňují dále 4 přílohy, detailně doplňující údaje předchozích kapitol.

Diplomová práce je napsána srozumitelně s malým množstvím překlepů, zdroje použité literatury jsou řádně citovány.

Lze shrnout, že diplomová práce Bc. Lenky Hrabákové je aktuálním souhrnem informací o problematice a možnostech aplikace metody mikročipů pro diagnózu čtyř rostlinných virů. Během jejího zpracování se diplomantka seznámila s řadou moderních molekulárních technik, prokázala schopnost výborné orientace v rozsáhlé odborné literatuře, její zhodnocení a využití pro vlastní práci. K dosaženým výsledkům zaujala kritický tvůrčí postoj, který ji umožnil zdárně v práci pokračovat a dosáhnout většiny plánovaných výsledků.

Předložená práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou - **výborně**.

Oponent: Ing. Petr Dědič, CSc.



V Havlíčkově Brodě 3.1.2014 .

K práci mám následující připomínky a dotazy, které jsou spíše doplňkového charakteru a ke kterým může diplomantka zaujmout stanovisko v diskusi při obhajobě:

- Na s.1. - bylo by vhodné namísto divokých uvádět planých
- s.1. - domníváte se, že již dochází k rutinnímu rozvoji detekce pomocí PCR ?
 - s.2. - PPV není přenášén semeny ? uvést jednoznačněji
 - s.10. - u ELISA je možné detekovat v každé reakci jen jeden patogen ? a co technika uměle polyvalentních protilátek nebo Luminex ?
 - s.21. - uvést koncentraci primerů v rozpisu PCR reakce
 - s.23. - používaný mikročip je komerčně dostupný?