

Posudek oponenta na bakalářskou práci

Autor práce: Michaela Svitáková

Název práce: *In vitro* metody studia imunitního systému včel.

Oponent práce: Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	5
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	5
3	Naplnění cílů práce	5
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	4
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	4
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	4
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	3
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	4
9	Grafická úprava textu a obrázků	4
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	3
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	5
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	3
Celkem bodů		49

max
60

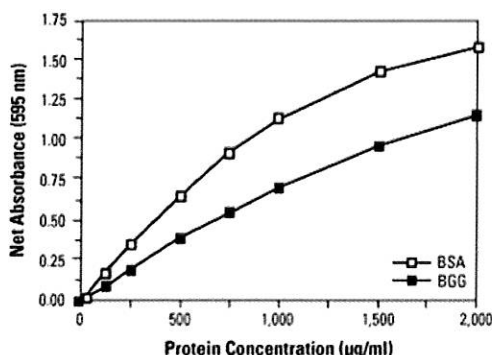
Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Studentka Michaela Svitáková se ve své bakalářské práci věnovala analýze biochemických parametrů ve vzorcích včel odebraných ze včelstev v různou roční dobu, dále sledovala vliv složení potravy včel, které se vylíhly v laboratorních podmínkách a od stáří jednoho dne byly krmeny různou potravou a v poslední řadě studentka optimalizovala metody detekce antimikrobiálních peptidů elektroforetickými a imunochemickými metodami.

V literární rešerši se studentka detailně věnuje imunitnímu systému včel a vlivu včelích patogenů a parazitů na zdraví včelstev, chovu včel *in vitro*. Dále také popsala princip metod, jež používala pro detekci. V této části je vysoký počet překlepů, objevují se citace s chybami. Namátkou na straně 9 (Reddy *et al.*, 2004, Danihlík *et al.*, 2015 atd nebo anglicky Vilmos and Kurucz, 1998 na straně 5. Je užito stejného číslování jiných kapitol (kapitola 2.1.2 pro sociální imunitu na straně 2 a také pro buněčnou imunitu na straně 4) nebo číslo chybí 2D-PAGE (str.26).

V experimentální části studentka detekovala antimikrobiální peptidy, porovnávala koncentrace proteinů v hlavičkách, hrudnicích a zadečcích zdravých a infikovaných včelstev, dále měřila aktivitu enzymu katalasy, který je indikátorem oxidačního stresu a sledovala vliv různého složení potravy včel, které byly krmeny v laboratorních podmínkách. Zde bych chtěla upozornit na zcela nesprávnou kalibraci pro výpočet proteinů metodou dle Bradforda na straně 42. V přednáškách i laboratorním

cvičení z biochemie (2. ročník) se učí, že závislost absorbance při 595 nm na koncentraci proteinu je lineární asi do 1 mg/ml a měla by procházet nulou (viz obrázek 1 pro kit od výrobce ThermoScientific).



Obr. 1.: Coomassie (Bradford) Assay Kit (ThermoScientific)

Proto by mne zajímalo, jak mohla studentka naměřit exponenciální kalibrační křivku a z ní počítat poté koncentrace proteinů? Popírá totiž platnost Lambert-Beerova zákona $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, z něhož plyne, že závislost absorbance na koncentraci je jednoduše lineární! Od toho se odvíjí můj další dotaz, jelikož se dále počítalo s koncentrací proteinů a specifickou aktivitou, jsou výpočty opravdu správné nebo je nutné vše přepočítat?

Pro výpočet specifické aktivity katalasy používáte metodu Aebi (1984). Jedná se o spektrofotometrické měření při 240 nm. Můžete vysvětlit princip měření a výpočtu?

Velice oceňuji statistické vyhodnocení, které vyžadovalo zpracování velkého množství dat. V popisku obrázku 15 zmiňujete statistickou analýzu pomocí one-way ANOVA. Byl použit stejný způsob vyhodnocení i pro ostatní výpočty? Můžete tento postup více přiblížit?

Při porovnání specifické aktivity katalázy vyplývá, že včelstvo 24 bylo vystaveno menšímu oxidativnímu stresu než včelstva 23 a 131. Máte nějakou hypotézu, proč a čím byla včelstva 23 a 131 více stresována než včelstvo 24, když všechny pocházely ze stejné včelnice?

V experimentální části studentka ještě porovnává přenos proteinů hemolymfy včel na nitrocelulózovou a PVDF membránu a následnou imunodetekci pomocí protilátek. Zde bych jen podotkla, že v případě porovnání těchto dvou membrán je nutné použít rozdílné blotovací pufrů a ověřit vliv přídavku SDS nebo alkoholu. Je známo, že použití SDS v blotovacím pufru zvyšuje přenos proteinu z gelu na membránu, ale současně snižuje vazbu na nitrocelulózu. Proto je SDS vhodné kombinovat s použitím PVDF membrány. Alkohol má opačný efekt oproti SDS – snižuje přenos proteinu z akrylamidového gelu, ale podporuje navázání proteinů na membránu. Je proto předčasné tvrdit, že pro detekci antimikrobiálních peptidů včel je vhodná pouze NC membrána.

Práce jinak splnila vytčené cíle.

Chyby, které je nutno opravit

Kalibrace pro výpočet proteinů metodou dle Bradforda na str. 42.

Závěr: práci doporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne: 1. 6. 2017

Podpis

Hodnocení:

- A- 56-60
- B- 51-55
- C- 46-50
- D- 41-45
- E- 36 -40
- F- 35 a méně