

Posudek oponenta

Autor práce: Petr Plevák

Název práce: Příprava rekombinantního enzymu metabolismu sacharidů v sóji

Typ práce: Bakalářská

Jméno oponenta práce:

	Kritérium hodnocení	Hodnocení						
		A	B	C	D	E	F	nelze hodnotit
1	rozsah práce, vyváženost rozsahů jednotlivých částí a jejich strukturovanost		X					
2	kvalita literární rešerše (např. množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)			X				
3	naplnění cílů podle zadání práce a poznatků z literární rešerše		X					
4	správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (např. srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)					X		
5	správnost používání citačních odkazů (např. přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací)	X						
6	výstižnost souhrnu práce v českém a anglickém jazyce				X			
7	grafická úprava textu a obrázků			X				
8	jazyková a stylistická úroveň, respektování platné nomenklatury a terminologie	X						
9	volba vhodných experimentálních metod	X						
10	srozumitelnost a výstižnost popisu používaných metod	X						
11	úroveň zpracování experimentálních dat		X					
12	adekvátnost interpretace dílčích experimentálních dat		X					
13	diskuze (souhrn získaných výsledků a jejich začlenění do kontextu dosavadního výzkumu)		X					

Poznámka 1: Pokud charakter práce nedovoluje použít některé z Kriterií hodnocení, použijte sloupec "nelze hodnotit"

Poznámka 2: Hodnocení křížkujte

Poznámka 3: Do výsledné známky se započítávají jen hodnotitelné položky

*- doplňte „bakalářská“ nebo „diplomová“

Známka

B

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list), slovní zhodnocení proč oponent hodnotil tímto způsobem (zejména při horším známkování)

Bakalářská práce studenta Petra Pleváka se zabývá přípravou rekombinantního enzymu alfa-galaktosidasy MelA z bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* var. *nato* v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris* pod konstitutivním i indukovatelným promotorem. Kapitoly teoretické části na sebe logicky navazují a poskytují přehled o dosud známých poznatcích o využití alfa-galaktosidas v biotechnologiích, včetně encyklopedického výčtu sacharidů a jejich metabolismu.

V praktické části student popisuje proces přípravy rekombinantního proteinu MelA od klonování jeho genu do expresních vektorů, přípravy transgenních linií, jejich selekci a ověření až po expresi samotné alfa-galaktosidasy a ověření její aktivity. Bohužel celý systém ještě potřebuje další optimalizaci, protože izolovaný enzym nemá alfa-galaktosidasovou aktivitu. Z výsledků práce je patrné, že student strávil enormní množství času v laboratoři a věnoval tématu značné úsilí. Je proto škoda, že sepsaná bakalářská práce obsahuje jak formální, tak i faktické nedostatky, které se odrazily ve sníženém hodnocení práce.

Formální poznámky:

V biologickém materiálu uvádíte, že jste použil „Gen pro MelA“. Uvítala bych minimálně identifikaci podle Genbank ID a dále vektor a způsob, jakým jste ke konstruktu přišel, tak jak popisujete dále v textu.

Spíše než obrázek 2 – struktura glykogenu - bych uvítala znázornění nebo porovnání s vazbami podjednotek v stachyose a rafinose.

Obrázek 5 – glykolýza: Ilustrovaný proces bych obohatila aspoň o vstup alternativních sacharidových jednotek, jinak není relevantní.

Kapitola 2.4. - Sója jako zdroj sacharidů – Zde jsou čerpány zdroje z minulého století, a pozornosti tak unikají fytoestrogeny, isoflavony a unikátní zastoupení mastných kyselin v sóje, kvůli kterým sójové produkty hrají důležitou roli v rostlinné produkci.

Obrázek 19 - Uvítala bych označení začátku a konce genu tak jak se to obvykle dělá, s kodonovým uspořádáním, takto sekvence nic neříká..., navíc bych sekvenci prezentovala jako porovnání s nativní sekvencí genu pro MelA místo obrázku 23.

U Tabulek 2 a 4 by bylo lepší informace o zásobních a finálních koncentracích uvést jednotně v tabulkách a ne pouze částečně v textu.

Tabulka 6 – Sekvence primerů se obvykle doplňují o informaci o Tm a GC uvedených primerů.

Připomínky a dotazy:

1. Co je „Natto“???
2. Vysvětlíte fenotypy Mut⁺ a Mut^S a nutnost selekce těchto fenotypů?
3. V kapitole 3.2.18 píšete, že při konstitutivní expresi je gen neustále v malém množství přepisován... co je pro vás „malé“ množství, jmenujte alternativní konstitutivní promotory a porovnejte sílu jejich exprese.
4. Píšete, že vzorky odebrané v časových intervalech byly odebírány zároveň s indukcí. Za jak dlouhou dobu po indukci dosahuje exprese svého maxima? Nebylo by lepší odebírat vzorky v těchto intervalech?

5. Sekretuje *B. subtilis* var. *natto* přirozeně MelA ven z buněk? Jaké bylo OD kultury, kterou jste použil jako pozitivní kontrolu? Jaká byla koncentrace celkových proteinů této kontroly v porovnání s transgenními kulturami? Aproximace obsahu nativního proteinu versus rekombinantního by pomohla objasnit stanovení aktivity alfa-galaktosidasy měřených vzorků... Jaký je přibližný obsah rekombinantního proteinu v expresním systému *Pichia pastoris* na celkové proteiny? U měření aktivity MelA bych navíc doporučila použít pozitivní kontrolu s p-NP, navíc, přípravou koncentrační řady by bylo možné stanovit limit detekce a zjistit tak, zda-li měříte ve vhodném detekčním limitu.

Prosím následující nedostatky doplňte a připojte jako Erratum, případně odpovězte na dotazy:

6. Obrázek 17 - chybí popisky - co je 1, 2 a 3, 4? Zapomněl jste popsat marker. Proč se 1 a 2 liší, kdežto 3 a 4 nikoli? Co jsou neskutečně intenzivní fragmenty u každého vzorku?
7. Obrázek 26 - A, B, C, D – Chybí vysvětlení.
8. Obrázek 31 – Graf absorbance p-NP: Jedná se o zásadní výsledek práce. Uvítala bych průměr replikátů se směrodatnou odchylkou, aby bylo zřetelné, jedná-li se o signifikantní rozdíl mezi vzorkem a negativní kontrolou. Je nezbytné doplnit, z jakého expresního systému byl supernatant získán – indukovatelného nebo konstitutivního? Popisek tohoto obrázku je zcela nedostatečný, prosím, doplňte.

Na závěr bych chtěla podotknout, že prezentované výsledky hluboce přesahují rozsah běžné bakalářské práce, díky čemuž si Petr Plevák osvojil celou plejádu molekulárně biologických metod.

Závěr: Práci doporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne 19.5.2016: Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.

Podpis: