

doc. Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

Brno

Posudek oponenta na disertační práci Ing. Michaely Čutové „Izolace a analýza DNA se zaměřením na mikroorganismy důležité v potravinářství“

Ing. Michaela Čutová se v disertační práci zabývala optimalizací izolace nukleových kyselin; tato část zahrnovala lýzi buněk *Lactobacillus paracasei*, optimalizaci koncentrace soli při srážení DNA, vliv iontové síly na efektivitu separace DNA pomocí nosičů a extrakci DNA z různých mléčných výrobků pomocí magnetických nosičů v kvalitě vhodné pro následnou analýzu PCR. Dále se ing. Čutová věnovala identifikaci specifických sekundárních struktur v genomech vybraných druhů mikroorganismů využívaných v potravinářských biotechnologiích bioinformatickými přístupy. Výsledky získané během řešení disertační práce jsou součástí dvou publikací – v *Mlékařských listech* a časopise *Molecules* (IF 3.06), kde je ing. Čutová první autorkou respektive sdílenou první autorkou, a rukopisu, který byl odeslán na posouzení do redakce časopisu *Genomics* (IF 3.16), Michaela Čutová je první autorkou. Dále je předložen seznam konferenčních příspěvků – zde postrádám informaci o jakou konferenci se jednalo a kdy a kde se konala. Stejně tak u projektu „Identifikace bakterií z přípravku pro biodegradaci lipidů molekulárně biotechnologickými metodami“ není jasné, zda byla ing. Čutová řešitelkou nebo členkou řešitelského týmu.

Teoretická část práce je dostatečně detailní pro uvedení čtenáře do řešené problematiky. Dovolila bych si upozornit na občasně formulační nepřesnosti, které pravděpodobně souvisejí s opakovanou editací textu. Cíle práce jsou dobře formulovány; přivítala bych informaci o účelu optimalizace přípravy buněčných lyzátů a izolace nukleových kyselin. Ke kapitole Experimentální část mám připomínky týkající se formálního zpracování: uvádíte, že médium MRS bylo připraveno dle návodu výrobce, ale výrobce není uveden (str. 31); 80 ml destilované vody pravděpodobně nebylo rozpuštěno v 12,1 g Tris-base (str. 31); pokud chcete získat 100 ml pufru TE, je třeba přidat 200 μ l 0.5 M EDTA, aby byla výsledná koncentrace 0.001 M, ne 100 μ l, jak je

uvedeno na str. 32; 2.5× větší množství ethanolu – není jasné větší než co (str. 42); nekonkretizujete úsek (gen?), který byl amplifikován PCR, pouze velikost ampliconu (str. 43) Přes tyto výhrady musím konstatovat, že tato část práce je zpracovaná přehledně a přiměřeně detailně.

Značná část výsledků je věnovaná optimalizačním metodám. Jelikož data z bioinformatických analýz jsou součástí dvou publikací, z nichž obě (jak je známo v době, kdy vzniká tento posudek) prošly úspěšně recenzním řízením, zaměřím se ve svých dotazech na optimalizační experimenty.

- Na základě čeho byly hodnoceny intenzity bandů PCR produktů (Obr. 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24), byla provedena denzitometrická analýza intenzity proužků?
- U většiny izolátů DNA je jejich čistota (poměr A260/A280) hluboko pod optimem (Tabulky 15, 16, 17, 18, 19, 20); vzala jste tento fakt v úvahu při interpretaci výsledků?
- Dlouho jsem přemýšlela, v jakém vztahu jsou výsledky prezentované v Tabulkách 15, 16 a na Obrázku 11 – můžete, prosím, vysvětlit, jak byla koncentrace DNA ($\mu\text{g/ml}$) přepočítána na množství DNA získané ze 100 μl buněčného lyzátu? Domnívala jsem se, že pro extrakci DNA různými metodami bylo použito vždy stejné množství buněčného lyzátu (detaily fenol-chloroformové extrakce nejsou v kapitole 3.13.1 specifikovány).
- Na základě rozdílů v koncentracích DNA izolované z kultury *Lactobacillus paracasei* po lyze 4% Práškem A po dobu 1 a 3 hodiny (Tabulky 17, 18) mě zajímá, zda jste stanovovala míru variability jednotlivých metod prováděním a hodnocením nezávislých pokusů.
- Jak si vysvětlujete, že přes vysokou koncentraci DNA izolované z Jogobella jogurt mango (Tabulka 19) nebyl detekován PCR produkt (Obrázek 16) nebo byly jeho intenzity ve srovnání s ostatními testovanými vzorky nižší (Obrázek 17)? Může to být tím, že vyizolovaná DNA není z *Lactobacillus paracasei*, ale z případných kontaminantů? Můžete navrhnout, jak by se toto dalo dokázat?
- V experimentech popisovaných v kapitole 4.1.6 uvádíte, že roztok A (10 mM Tris, 5 mM EDTA - bez lysozymu) byl použit jako kontrola. Myslíte tím negativní kontrolu? Jak vysvětlujete proužky DNA na Obr. 18 (i když relativně nízké intenzity) získané po lýze roztokem A? Pokud bychom zvažovali jistou míru spontánně lyzovaných buněk, jak vysvětlíte velice slabý proužek DNA (či jeho absenci) ve vzorcích lyzovaných 4% Práškem A?
- Jak posuzujete míru adsorpce DNA na nosič (str. 68), dle nejnižší koncentrace DNA v supernatantu (Obrázek 21)? Bylo cílem experimentů DNA navázanou na nosič eluovat? Koncentrace DNA v eluátech byla relativně nízká (Obrázky 21, 22); ale je třeba vzít v úvahu, že nejsou k dispozici údaje o objemech vzorků, v nichž byla koncentrace DNA měřena.

- Obávám se, že vhodnost použití polymerních nosičů pro izolaci DNA, která následně slouží jako templát pro PCR, zpochybňuje fakt, že u výrobků Smetanový jogurt Florian-jahoda a Naše BIO jogurt jahodový OLMA, byly detekovány velmi silné bandy PCR produktů u DNA izolované fenol-chloroformovou extrakcí, ale ne za využití nosičů (Obrázek 24). Na druhou stranu, výsledky získané s bílými jogurty jsou konzistentní, i když bandy PCR produktů u vzorků DNA izolovaných pomocí nosičů v prostředí fosfátového pufru jsou slabší (Obrázek 23). Zarazilo mě proto, že pokud byla izolace DNA provedená za využití polymerních nosičů v prostředí PEG a NaCl, byly PCR produkty detekovány pouze u výrobku Klasik bílý jogurt OLMA (výsledky nejsou prezentovány) – ačkoliv v přechodí analýze to byl jediný výrobek, který neposkytl po PCR detekovatelný band produktu (Obrázek 23). Mohla byste se, prosím, k těmto výsledkům vyjádřit?

Závěrečné hodnocení

I přes výše uvedené námítky konstatuji, že v disertační práci byly splněny vytyčené cíle či byly provedeny experimenty, které měly k těmto cílům vést. Publikací článků v mezinárodních recenzovaných časopisech prokázala ing. Michaela Čutová svoji způsobilost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje. Studentka prokázala tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a disertační práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v daném oboru.

Disertační práci ing. Michaely Čutové doporučuji k obhajobě.

v Brně, 22. 11. 2019

Miloslava Fojtová