

POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: **Optimalizace podmínek purifikace enzymů z biologického materiálu**

Autor diplomové práce: **Bc. Jan Dosedla**

Oponent: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**

Cílem předložené diplomové práce bylo optimalizovat proces purifikace glutathionreduktázy z biologického materiálu.

Text diplomové práce je členěn do kapitol: úvod, teoretická část, cíl práce, experimentální část, výsledky a diskuze.

V úvodu teoretické části autor popisuje strukturu a funkci glutathionu. Další kapitoly jsou věnovány glutathionreduktáze, její funkci, struktuře a možnosti stanovení její aktivity. V závěru teoretické části jsou uvedeny separační postupy.

V experimentální části jsou nejprve popsány metody stanovení koncentrace proteinů a aktivity glutathionreduktázy. Dále byla provedena optimalizace precipitace standardu glutathionreduktázy a optimalizace precipitace glutathionreduktázy z lidské krve síranem amonným. Nakonec byla provedena purifikace standardu glutathionreduktázy a glutathionreduktázy z lidské krve metodou afinitní chromatografie.

Ve výsledkové části jsou popsány dosažené výsledky. Text je doplněn grafy a tabulkami. Ze získaných výsledků vyplývá, že se podařilo purifikovat glutathionreduktázu z lidské krve, ale s nižším výtěžkem a stupněm očištění než v dříve publikovaných pracích.

Přehled použité literatury svědčí o dobré teoretické přípravě. Autor pro zpracování diplomové práce použil celkem 67 literárních zdrojů.

K předložené diplomové práci mám následující připomínky a dotazy:

- V textu práce je podle mého názoru zbytečně hodně volného místa a přesto je práce sepsána na 47 stranách, což je menší počet, než je u diplomových prací KBBV obvyklé a doporučované.
- V textu je řada překlepů a gramatických chyb, nejednotný zápis názvu enzymu, často nejednotná forma zápisu slov, kde jsou možné 2 varianty (organismus/organizmus), případně chybný zápis (glukoza).
- Některé zkratky nejsou vysvětleny (GCLC, GCLM), jiné jsou vysvětleny 2x (GGT).

- Latinské názvy (např. bakterie) se píšou kurzívou.
- Str. 40: chybně uvedený rozměr ϵ .
- Některé tabulky (např. Tab. IX, X) a grafy (např. Graf 3, 4) jsou v textu zařazeny, aniž by byly zmíněny v předchozím textu.
- Str. 54: názvy Tab. XII a XIII jsou stejné a nevystihují obsah tabulek.
- U grafů, ke kterým jsou přiloženy na konci práce přílohy, bych doporučila vložit poznámku „viz příloha č. ...“. Takto je trochu složitější se v přílohách orientovat.
- Postrádám krátké shrnutí práce v kapitole Závěr.

Dotazy:

1. Str. 16, řádek 6: „GCLM ovlivňuje hodnotu Michaelisovy konstanty K_m enzymu pro glutamát a citlivost enzymu na zpětnovazebnou inhibici koncentrací GSH.“ Jakou koncentrací GSH?
2. Str. 25, řádek 17: „A jelikož při narušení buněk je uvolněn nejen zkoumaný enzym, ale také proteázy, je nutné do pufrů přidávat ještě různé inhibitory.“ Můžete prosím uvést, jaké inhibitory proteáz se používají při separaci glutathionreduktázy?

Závěrem konstatuji, že práce splňuje zadání, nicméně výše uvedené připomínky její kvalitu snižují.

Z uvedených důvodů **doporučuji** diplomovou práci k obhajobě a hodnotím známkou **velmi dobře**.

V Pardubicích 20. 5. 2015


Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.