

## *Oponentský posudek diplomové práce*

Autor: **Bc. Kateřina Netušilová**

Název: **Optimalizace použití trypsinu imobilizovaného na magnetických mikročásticích pro proteomické účely**

Enzymatická digesce je nedílnou součástí mnoha proteomických experimentů a kritickým způsobem ovlivňuje úspěšnost následné analýzy. Tato práce má za cíl aplikovat výhody použití magnetických částic s imobilizovaným trypsinem pro digesti proteinů v roztoku a porovnat tento přístup s klasickou metodou štěpení proteinů v roztoku pomocí metod MALDI-TOF MS a RP-HPLC.

K předkládané práci mám následující připomínky, resp. dotazy:

- čísla stránek by mohla být uvedena od kapitoly „Anotace“ až po „Obsah“ včetně
- kap. „Anotace“, ř. 2: specifickou → specifitou
- v celé práci by místo označení „MALDI-TOF“ bylo lépe používat označení „MALDI-TOF MS“
- kap. „Summary“: ř. 2: Lysine → lysine, ř. 20: onbound → unbound, ř. 21: leas → least
- kap. „Zkratky“: 2D neznamená „dvourozměrný gel“; ř. BNPS-skaton – na konci řádku je přebytečné „u“; ř. LC - Liquid → Liquid; ř. SiMAG – v sousloví „karboxylovoufunkční“ chybí mezebra
- kap. „Obsah“: název kapitoly 2.6.3.2: kapalinová → kapalinové
- číslování citací by mohlo být dle pořadí, v jakém byly poprvé použity v textu (např. str. 13, citace [1], [5])
- str. 19, ř. 1: Jak vyplývá z předchozí rovnice, že reakční rychlost je přímo úměrná koncentraci enzymu?
- str. 20, ř. 4: rychlost → rychlosti
- str. 31, ř. 3-4: u koncentrací molekul chybí jednotky
- str. 32, ř. 8: Co se myslí pod pojmem „plamenová ionizace“?
- str. 33, ř. 11: V metodě FT-ICR: co musí být supravodivé a za jakým účelem?
- str. 34, ř. 9: tandemový hmotnostní spektrometr není vždy jen spojení dvou analyzátorů přes kolizní celu
- str. 35, ř. 30: liquid → liquid
- str. 40, ř. 3: Jaký byl použit trypsin? Hovězí nebo vepřový?
- str. 40, ř. 18: Jaká zde byla použita kolonka?
- str. 40, název kapitoly 3.3: Nejedná se spíše o stanovení aktivity trypsinu?
- str. 42, kap. 3.4.3: Jedná se skutečně o odsolení, jestliže nakonec frakce obsahují 0,1 M fosfátový pufr?
- str. 44, ř. 12: štěpení BSA brání 34 cysteinů spojených disulfidickými můstky,  $\alpha$ -casein v procesované formě neobsahuje žádný cystein a cytochrom c obsahuje cysteiny dva (s navázaným hemem)
- str. 44, ř. 15: Probíhala redukce a alkylace BSA v přítomnosti nějakého pufru?
- str. 47, tab. 3.1: rozsah hmotnostního spektra byl pravděpodobně větší
- str. 48, ř. 19: složení mobilní fáze B pravděpodobně obsahovalo větší podíl acetonitrilu
- str. 50, ř. 6: pro lepší orientaci by bylo vhodné jednotlivé frakce naředit (vysoká hodnota absorbance >3)
- str. 51, poslední řádek: „11,95  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ “ není aktivita, ale koncentrace
- str. 53, obr. 4.3: Je nějaké vysvětlení pro „zmizení“ píku 1168 po celonoční digesti?
- str. 63, tab. 4.4: Proč se peptid VLASSAR se vyskytuje dvakrát pro různé hodnoty m/z?
- str. 65, obr. 4.17: označení jednotlivých píků v hmotnostním spektru není vždy správné, např. cytochrom c  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  je označen pík s m/z přibližně 18 000
- str. 69, tab. 4.5b: Proč mají píky 3209,71 a 3211,17 stejnou sekvenci?
- obr. 4.27, 4.34, 4.41, 4.47: není jasné, zda uvedené poměry značí poměr enzym/protein nebo protein/enzym
- str. 84, ř. 1-2: Dají se uvedené hmotnosti proteinů použít v případě kalibrace hmotnostních spekter?
- citace [43]: správně má být „Trends in Analytical Chemistry“; citace [54]: správně „Proteomics“

Přes uvedené připomínky předkládaná práce splňuje stanovené cíle zadání. Zpracovaný přehled literatury je v přiměřeném rozsahu a dodržuje citační normy. Obsahová a formální stránka práce je až na několik málo výjimek v pořádku. Autorka též prokázala aktivní přístup k samostatné práci a proto **doporučuji předloženou diplomovou práci k obhajobě** a navrhuji hodnocení **v ý b o r n ě**.

V Hradci Králové dne 19. května 2009

*Pavel Řehulka*

RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.  
Ústav molekulární patologie FVZ UO  
Třebešská 1575  
500 01 Hradec Králové