

Oponentský posudek diplomové práce

Autor: **Bc. Lucie Vítková**

Název: **Optimalizace enzymatického štěpení proteinů pro účely rychlé přípravy proteomických vzorků**

Enzymatická digesce trypsinem je velmi častým zpracováním proteinů a proteinových směsí před vlastní proteomickou analýzou. Časová náročnost tohoto experimentálního kroku někdy bývá limitujícím faktorem při analýze a proto existují četné snahy tento proces zoptimalizovat a zkrátit. Tato práce má za cíl porovnat efektivitu štěpení proteinů trypsinem v roztoku a kovalentně navázaným na magnetickém nosiči za změněných podmínek vyšší teploty a působením vysokého tlaku, a to jak z kvalitativního, tak i kvantitativního hlediska. Ze závěrů práce vyplývá, že zvýšená teplota (55 °C) po dobu 120 minut při aplikaci trypsinu v roztoku poskytuje ve srovnání s klasickým štěpením trypsinem v roztoku při 37 °C z kvalitativního hlediska srovnatelné výsledky a z kvantitativního hlediska lepší výtěžnost peptidů.

K předkládané práci mám následující připomínky, resp. dotazy:

- anotace, ř. 4: vysoká specifita a reprodukovatelnost se může v případě konkrétních enzymů hodně lišit
- anotace, ř. 5-7: zaručuje hydrolyza vazeb na C-konci lysinu, resp. argininu vždy vznik peptidů s vhodnou hmotností pro MS analýzu? Pokud ne, můžete uvést příklad bílkovin, které se chovají netypicky?
- anotace, ř. 13: protein „betagalaktosidasa“ se spíše píše odděleně (s pomlčkou): beta-galaktosidasa; podobně v kapitole „Summary“ lepší použít název „beta-galactosidase“
- seznam zkratk obsahuje několik nepřesností a překlepů:
 - o 2D neznámá dvourozměrnou elektroforézu
 - o Acetomitril → Acetonitril
 - o deoxiribonukleová → deoxyribonukleová
 - o dithiotreitol → dithiothreitol
 - o ESI znamená „ionizace elektrosprejem“
 - o protecinů → proteinů
 - o kpsi: Pound → Kilopound...
- některé zkratky by mohly obsahovat pomlčky, např.
 - o Q-TOF, Q-TRAP, MALDI-TOF
- str. 17, obr. 1: karboxypeptidáza
- str. 17, ř. 14: opravdu trypsin štípe rychleji za lysinem než za argininem?
- str. 18, ř. 2-3: proč se NH_4HCO_3 používá s oblibou jako digesční pufr pro tryptické štěpení?
- str. 18, ř. 5-6: co znamená pojem „vhodné prostředí“ při použití 2M močoviny
- str. 21, ř. 11: imobilizovaný trypsin
- str. 22, ř. 19: glutymové → glutamové
- str. 31, ř. 5: Er_YAG → Er-YAG
- str. 33, ř. 6-8: opakovaně použito „násobiče elektronů s kontinuální dynodou“
- str. 37, ř. 21: Biosystème → Biosystems
- např. str. 41: mezi číslem a jednotkou by měla být mezera
- str. 46, ř. 25: pufremdo → pufrem do
- str. 47, ř. 10: uvádět tlak v Pascalech
- str. 48, ř. 2: co znamená „nízkomolekulární roztok matrice DHB“

- str. 49, tabulka 3: proč je použitý typ analyzátoru „MALDI TOFTOF“
- str. 52, graf 1: je vhodné měřit vzorky s absorbcí větší než 1 až po příslušném naředění
- str. 52, graf 1: jedná se o závislost absorbance na množství trypsinu, nikoli opačně; mj. aktivita enzymu je zde často zaměněna s pojmem množství enzymu
- str. 53, ř. 3: postup č. 3.3 má být postup č. 3.4
- str. 54, table 1: má smysl počítat směrodatnou odchylku pro dvě měření?
- str. 70, ř. 9: dasaženo → dosaženo
- seznam literatury není zcela jednotný a obsahuje překlepy, např.
 - o citace [2-8]: spektrometry → spectrometry
 - o citace [26]: neopodstatněné použití velkých písmen v názvu práce
 - o citace [28]: neúplný odkaz atd.
- příloha str. 56 a dále: nejedná se zde ani tak o seznam peptidů jako spíše o seznam MRM přechodů pro citlivou detekci zmíněných peptidů v komplexním vzorku metodou MRM

Přes uvedené připomínky předkládaná práce splňuje stanovené cíle zadání. Zpracovaný přehled literatury je v přiměřeném rozsahu a přes některé chyby a překlepy 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 **výborně**.

V Hradci Králové dne 21. května 2010

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