



## Posudek vedoucího diplomové práce

Název diplomové práce: **Analýza proteinů s využitím imobilizovaného Clostripainu a techniky Selected Reaction Monitoring (SRM)**

Autor práce: **Bc. Jana Baronová**

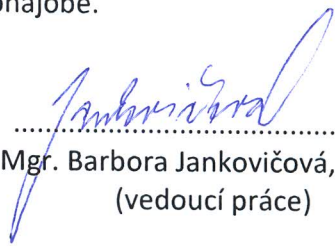
Tématem diplomové práce byl proteolytický enzym Clostripain. Cílem byla jeho imobilizace na vhodný magnetický nosič a následné použití pro účinnou fragmentaci proteinů v rámci jejich analýzy hmotnostně-spektrometrickou technikou monitorování vybraných reakcí.

V teoretické části autorka shrnula základní informace o proteolytickém enzymu Clostripainu a magnetických mikročasticích jako stacionární fázi vhodné pro imobilizaci bioaktivních ligandů, popsala možnosti a výhody použití imobilizovaných forem enzymů, což doplnila o informace týkající se techniky monitorování vybraných reakcí, jejím využitím v proteomice a nakonec popsala proteinový toxin ricin, pro jehož analýzu byla technika zaváděna. Téma je zpracováno přehledně a srozumitelně a studentka k tomu použila více než 130 převážně zahraničních literárních zdrojů, jejichž přehled je v práci zpracován podle citačních norem.

V experimentální části jsou uvedeny metody imobilizace Clostripainu na různé magnetické částice lišící se porozitou, velikostí a funkčními skupinami včetně určení navázaného množství stanovením aktivity enzymu pomocí nízkomolekulárního substrátu, dále pak postupy použití vybraných magnetických částic s imobilizovaným enzymem pro štěpení nejprve modelového proteinu BSA a poté toxinu ricinu, optimalizací podmínek štěpení a přípravy proteinového vzorku a nakonec pak metody SDS-PAGE a monitorování vybraných reakcí, které byly použity pro ověření účinnosti štěpení a analýzu vzniklých peptidových fragmentů. Paralelně bylo provedeno srovnání se solubilní formou Clostripainu a dále pak standardně používaným proteolytickým enzymem trypsinem. Veškeré výsledky jsou v práci prezentovány jasně a přehledně. Studentce se podařilo optimalizovat metodu štěpení proteinů imobilizovaným Clostripainem a zavést ji jako alternativu štěpení trypsinem, která může v určitých aplikacích přinést užitečné doplňující informace. Studentka se tématu zhostila úspěšně a při řešení dílčích úkolů projevila samostatnost a zájem o danou problematiku. Postupy a výsledky pravidelně konzultovala s vedoucím práce a v laboratoři pracovala pečlivě a s rozvahou.

Práce obsahuje všechny náležitosti, její rozsah je 108 stran a po stránce obsahové i formální má velmi dobrou úroveň. Všechny dílčí úkoly zadání diplomové práce byly splněny a práci proto hodnotím známkou **výborně** a **doporučuji** ji k obhajobě.

V Pardubicích dne 24.5.2013

  
.....  
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.  
(vedoucí práce)