



Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Porovnání metod pro stanovení proteinů v biologickém materiálu**

Autor práce: **Bc. Karolína Štochlová**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Konzultant práce: **Mgr. Erika Roušarová**

Oponent práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací dvou vybraných metod pro stanovení koncentrace proteinů, konkrétně metody dle Bradforda a metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Pro srovnání metod bylo použito několik standardních proteinů (BSA, fibrinogen, γ -globuliny), komplexní biologické vzorky (tkáňové homogenáty myších jater a ledvin), a nakonec byla studována také interference stanovení použitím různých aminokyselin a farmak.

Diplomová práce má přiměřený rozsah (95 stran) a klasické členění, zahrnuje krátký úvod, teoretickou část (32 stran), následuje jednostránková konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (14 stran), výsledky jsou shrnuty na 17 stránkách, diskuze je uvedena na šesti stránkách a závěr pak na jedné stránce. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 93 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Teoretická část se věnuje struktuře, vlastnostem a dělení proteinů, včetně popisu vybraných zástupců (např. hovězího sérového albuminu), a dále metodám stanovení koncentrace proteinů. V experimentální části jsou popsány použité metodické postupy, zahrnují optimalizaci metody dle Bradforda a BCA, postupy stanovení v různých vzorcích a testování interference. Získané výsledky jsou doloženy formou tabulek a grafů ve výsledkové části popř. v příloze a jsou patřičně diskutovány.

Práce je sepsána srozumitelně s minimem stylistických neobratností a překlepů, po formální stránce splňuje požadavky na ni kladené a lze také konstatovat, že bylo dosaženo zadaných cílů diplomové práce.

K předložené práci mám pár drobných připomínek:

- některé obrázky uvedené v rámci teoretické části jsou v angličtině (Obr. č. 6 a 16), u Obr. 16 navíc není uveden zdroj,
- v obsahu chybí číslování hlavních kapitol (1, 2, 3,..), text je místy neuspořádaný ale především mám připomínku k členění kapitol v rámci teoretické práce, kdy veškeré podkapitoly jsou zařazeny pod kapitolu „2.1 Stavba bílkovin“, včetně metod stanovení koncentrace bílkovin, které by bylo vhodnější vyčlenit zvlášť,

- v práci je uvedeno několik nepřesností: např. na str. 35 je v nepřesném formátu vyjádřena molekulová hmotnost BSA (66.430 Da); na str. 51 v tabulce VIII je chyba v přípravě roztoku o koncentraci 10 µg/ml; na str. 59 chybí popisek u obrázku 18; na str. 60 v tabulce XIV není správně nazván první sloupec (nejedná se o koncentrace zásobního roztoku ale množství acetaminofenu v µmol); na str. 61 je uvedeno, že u kalibrace (graf 2) při laboratorní teplotě jsme zaznamenali vyšší počáteční absorpenci než v případě stanovení při 37°C (graf 3), což z grafů nevyplývá a vyjádření není přesné; na str. 63 je chybně uveden odkaz na grafy 5 a 6 místo 4 a 5.

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

- 1) V práci není uvedeno přesné složení roztoku kyseliny bicinchoninové, který se pro stanovení míchá s 4% roztokem síranu měďnatého v poměru 50:1. Není tak jasné, zda je při reakci zásadité prostředí požadované pro redukci měďnatých iontů?
- 2) Na str. 14 v teoretické části je uvedeno, že bílkoviny jsou složeny z mnoha aminokyselinových zbytků. Mohl by být tento údaj upřesněn a je nějaká limitace ve velikosti stanovovaných molekul u jednotlivých studovaných metod (BCA a dle Bradforda)?
- 3) Na str. 38 v tabulce VII je uvedeno, že metoda BCA je většinou nezávislá na aminokyselinovém složení, ve srovnání s metodou dle Bradforda. Prosím o bližší vysvětlení, čím je to ovlivněno?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínce, práce dosahuje dostatečné kvality a splňuje předpoklady potřebné pro **doporučení k obhajobě**, a s ohledem k uvedeným skutečnostem práci hodnotím známkou **velmi dobře**.

V Pardubicích dne 25.5.2015


.....
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.