



## OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: **Purifikace rekombinantní vakuolární aminopeptidázy Ape3p patogenní kvasinky *Candida albicans***

Autor práce: **Bc. Ondřej Morávek**

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

Oponent: **Doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Diplomová práce studenta **Ondřeje Morávka** se zabývá aktuálním tématem přípravy rekombinantních proteinů, v tomto případě enzymu aminopeptidázy Ape3p. Klíčovými kroky přípravy rekombinantních proteinů je nejen jejich vlastní produkce ve zvoleném organismu, *Candida albicans*, ale také jejich následná izolace, přečištění a v případě enzymu také ověření jeho aktivity. Na tyto kroky se student ve své práci zaměřil.

Diplomová práce je obvyklým způsobem členěna na teoretickou a experimentální část, na kterou navazuje výsledková část a závěrečné shrnutí dosažených výsledků. Teoretická část má povahu rešerše, je zpracována s využitím více než 120 literárních zdrojů, což dokazuje schopnost studenta pracovat s odbornou literaturou. Teoretická část je psána srozumitelně, s minimem překlepů a nepřesností, je doplněna pouze 1 obrázkem a 1 tabulkou. V nadpisech bych doporučila max. tři úrovně, ne čtyři. Literární zdroje jsou uvedeny v souladu s citační normou, jedná se o vědecké publikace.

Experimentální část obsahuje popis jednotlivých metod, které student využil v rámci experimentální části. U některých uvedených chemikálií není uveden přesný název (bisakrylamid, Tris). Výsledková je sepsána logicky tak, jak probíhaly experimenty, výsledky jsou odpovídajícím způsobem diskutovány a je vždy zdůvodněn následný experiment. Ve výsledkové části se student nevyhnul některým nepřesnostem. Proto mám k práci následující připomínky a dotazy. Dotazy k zodpovězení jsou zvýrazněny tučně:

1. str. 54, obrázek 2 – kalibrační závislost – mělo by být pouze lineární proložení a ne současně point-to-point.
2. str. 55, obrázek 3 a 4 – v legendě by mělo být uvedeno vysvětlení použitých zkratk, vzhledem k tomu, že není uvedeno ani v textu.
3. str. 57, poslední věta prvního odstavce – ...“na chromatografu nebyla vidět...” – má být na chromatogramu, chromatograf je přístroj.
4. str. 61 a dál, obrázky chromatogramů – jedná se o chromatogram, označení graf separace je nepřesné. Navíc u všech chromatogramů ve výsledkové části by měly být součástí legendy

i podmínky separace (průtok mobilní fáze, prostředí, rozměry kolony atd.). **Při jaké vlnové délce byla absorbance zaznamenávána?**

5. str. 65, obrázek 19 – v textu na straně 64 je uvedeno, že na obrázku je výsledek SDS-PAGE, ale jedná se o chromatogram. **Na obrázku 19 je ve 180. minutě záznamu pík, podle SDS-PAGE (obr. 20), ale frakce F8 nic neobsahuje. Čím si vysvětlujete přítomnost píku? Byla daná frakce analyzována i jinou metodou? Např. stanovením koncentrace proteinů? Stejný případ je i pro obr. 23 na straně 68 (frakce F8).**

6. str. 72 – **O jaký výsledek se jedná na obrázku 30? Není v textu popsán ani diskutován.**

7. str 73 a dál – stanovení koncentrace izolovaného rekombinantního proteinu – **Uvádíte, že změny absorbance byly při detekci nízké, na což jste reagoval změnou množství enzymu v reakci. Testoval jste i různé koncentrace substrátu? Nebo jste využíval jen uvedený 3 mM substrát? Pokud ano, na základě čeho jste volil, vycházel jste z literatury? Je vždy nutné najít i vhodnou koncentraci substrátu při stanovení enzymové aktivity.**

Závěrem bych ráda uvedla, že i přes výše uvedené výtky student prokázal schopnost práce s literaturou i experimentální práce. I když u izolovaného enzymu neprokázal významnou aktivitu, bezpochyby splnil zadání diplomové práce. Práci **doporučuji k obhajobě** a hodnotím ji známkou **B**.

**Doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**