

Posudok oponenta diplomovej práce

Autor práce: Bc. Jana Marečková

Názov práce: Korelace plochy pod píkom a koncentrací oligonukleotidu za použitia HPLC v závislosti na sekvenci a modifikaci oligonukleotidu.

Bc. Jana Marečková sa vo svojej diplomovej práci zaoberala koreláciou plochy pod píkom a koncentraciou oligonukleotidu za použitia HPLC v závislosti na sekvencii a modifikácii oligonukleotidu.

V teoretickej časti sa diplomantka venovala všeobecnému popisu nukleových kyselín a ich štruktúry, ďalej oligonukleotidom, ich syntézou, kvantifikáciou, purifikáciou a fyzikálne-chemickými vlastnosťami. Diplomová práca je písaná spôsobom odpovedajúcim fakultným zvyklostiam. Členenie práce do kapitol je však často nelogické, napr. kapitola oligonukleotidy by mala byť samostatnou kapitolou nadradenou kapitole syntéza oligonukleotidov. Diplomantka sa veľmi široko zaoberala samotnou syntézou oligonukleotidov aj keď sa vo svojej práci syntéze nevenovala. Naopak kapitoly, ktoré priamo súvisia s témou práce nie sú dostatočne spracované, napr. purifikácia pomocou RP-HPLC, prípadne kvantitatívne hodnotenie výsledkov HPLC. V celej diplomovej práci sú nesprávne uvádzané odkazy na citované zdroje v texte (odkazy na všetku zdrojovú literatúru uvedené vždy až na konci odstavca). Všetky kapitoly teoretickej časti obsahujú množstvo preklepov (napr. strana 25, *K níse*), nepresných formulácií (napr. strana 26, náhrada nevazebného atomu kyslíku), nesprávnych názvov (napr. chemických - *difenylfosfochloridát*), niekedy až vyložených nezmyslov („Výsledkem detritylace je odkrytí reaktivní 5'-hydroxyskupiny“).

V experimentálnej časti je popísaná metodika výberu oligonukleotidov a sond, definícia základných vlastností (molárny absorpčný koeficient, teplota topenia), jednotlivé analýzy vzoriek a spracovanie a analýza dát. Vo všetkých týchto kapitolách je množstvo nepresných formulácií a nesprávnych názvov. V kapitole venujúcej sa spracovaniu a analýze dát chýbajú u podkapitoly F-test vzorce pre výpočty hodnôt R^2 a \bar{R}^2 . V tabuľke 12 by bolo vhodné uviesť do komentára vzorec, akým boli hodnoty smernice k získané. Z obsahu kapitoly Analýza jednotlivých oligonukleotidů nie je jasné, čoho sa prediktívne modely vlastne týkajú a čo bolo predikované. Rovnako by bolo vhodné uviesť k jednotlivým modelom, čo ktoré číslo vo vzorci znamená a ako alebo odkiaľ bolo toto číslo získané. V popisoch grafov závislosti absorpcie vynásobenej objemom na ploche (pravdepodobne pod píkom) oligonukleotidov/sond chýbajú údaje pravdepodobne o testovaných koncentráciách/množstvách?

V rámci diskusie sú úvahy diplomantky o počte a type modifikovaných oligonukleotidov a ich vplyve na komplexnosť dát a tým pádom aj na výsledky samotnej analýzy správne. Rovnako aj úvahy o vplyve opakovaného rozmrazovania na HPLC analýzu. Čo však opäť znižuje kvalitu práce, sú napr. chýbajúce chromatogramy, ďalej nesprávne odkazovanie na citácie v texte práce či množstvo nepresných formulácií (absorbance, resp. množství).

Predkladaná práca má zbytočne široký teoretický záber. Čo sa týka experimentálnej časti bolo by vhodné uviesť, čo konkrétne robila diplomantka a čo robil niekto iný, napr. kto pripravoval vzorky na analýzu HPLC, kto analyzoval vzorky na HPLC atď.

Otázky a komentáre:

1. Na strane 25 máte názov kapitoly Postsyntetické úpravy. U čitateľa tento názov navodí dojem, že ide o postsyntetické metódy modifikácie reťazca oligonukleotidu, avšak v kapitole je popísané odštiepenie z pevnej fázy a ochránenie oligonukleotidového reťazca. Nebol by vhodnejší názov postsyntetické spracovanie?
2. Kapitola modifikácie oligonukleotidov na strane 26 je veľmi krátka a zaslúžila by si širšie spracovanie a to najmä kvôli nutnosti modifikované oligonukleotidy purifikovať pomocou HPLC, čo priamo súvisí s témou práce.

3. Na stranách 26 a 27 píšete: „Zcela jistě nepoužívanější a nejjednodušší metodou pro kvantifikaci oligonukleotidu je UV absorpční spektroskopie, která využívá schopnosti nukleotidů absorbovat záření v ultrafialové (UV) oblasti. Za tuto vlastnost může přítomnost heterocyklů, konkrétně rezonanční struktury purinových a pyrimidinových bází.“ Naozaj môžu za absorpciu svetla v UV oblasti rezonančné štruktúry purínových a pyrimidínových bází?
4. Molárny absorpčný koeficient nie je veličinou ale konštantou a je charakteristický pre každú látku.
5. Kapitola Ďalšie metódy stanovenia koncentrácie nukleových kyselín obsahuje podkapitolu nazvanú fluorescenčné značenie. Fluorescenčné značenie nie je metódou stanovenia koncentrácie nukleových kyselín. Popisovaná metóda nie je spektrofotometrickou metódou, ale o fluorimetrickou metódou.
6. Je rozdeľovacia chromatografia vhodná na purifikáciu oligonukleotidov?
7. Na strane 31 píšete: „...která pro separaci využívá kombinaci velikosti, difúzního koeficientu a povrchových vlastností molekuly...“ Prosím konkretizujte povrchové vlastnosti molekuly.
8. V kapitole HPLC s reverzními fázemi píšete o polárnych organických roztokoch, napr. acetonitril, metanol, atď. Naozaj ide o roztoky?
9. Na strane 32 píšete: „Dávkování mobilní fáze je možné provádět ve dvou různých módech; isokratickou či gradientovou elucí.“ Dávkovanie mobilnej fázy prebieha izokraticky alebo gradientovo. Elúcia popisuje vymývanie analytu z kolóny.
10. Na strane 32 píšete: „Zatímco u analytické chromatografie je žádoucí vysoký počet píků a nízký objem nástřiku, u preparativní HPLC je důležitý především pík žádoucího produktu a vyšší průtok pro co možná nejvyšší a nejrychlejší možný výtěžek na kolektoru frakcí.“ Je u analytickej HPLC žiaduci vysoký počet píkov? Čo máte na mysli pod pojmom najrýchlejší možný výťažok?
11. Na strane 33 píšete: „Při RP-HPLC se využívá stejného principu jako při OPC, tedy separace závislé na hydrofobních vlastnostech DMT skupiny.“ Hydrofóbne vlastnosti akých skupín sa využívajú pri RP-HPLC?
12. Kapitola fyzikálne vlastnosti – obsah GC báz vyjadrený v percentách nie je fyzikálnou vlastnosťou.
13. Kapitola chemické vlastnosti – za fyziologických podmienok je nabitá celá pentózofosfátová kostra oligonukleotidu, nie len terminálny fosfát.
14. Na strane 37 popisujete vplyv na HPLC separáciu. Definujte prosím slabšie rozpúšťadlo a silnejšiu kolónu.
15. Na strane 44 máte u sondy 82/17_HEX uvedené dve hodnoty molárneho absorpčného koeficientu. Ktorá z týchto hodnôt je správna?
16. Ako ste manuálne odčítali hodnoty absorpcie pri stanovovaní koncentrácie zásobných roztokov?
17. Prečo bol postup stanovenia koncentrácie purifikátov odlišný od postupu stanovenia koncentrácie zásobných roztokov?
18. Bolo by na účel práce možné použiť metódu stanovenia koncentrácie analytu pomocou vonkajšieho alebo vnútorného štandardu?
19. Doplníte prosím informáciu o gradiente použitom u HPLC purifikácie oligonukleotidov a sond.
20. Vysvetlite, ako zásadne sa hodnoty p , SDR a $\text{Adj. } R^2$, uvádzané u jednotlivých typov modelov, líšia a prečo.
21. Čo znamená Lineární (predikce C) v grafe 10?
22. Na strane 66 píšete: „Z výsledků analýz lze usuzovat, že závislost je opravdu lineární, hodnoty korelují a přímku lineární regrese lze tedy použít k hrubému odhadu výsledné absorbance, resp. množství.“ Odhadovali ste absorpciu alebo množstvo?
23. Strana 67, graf 11 – čím si vysvetľujete veľký rozptyl hodnôt u jednotlivých vzoriek a alikvotov sond?

24. Na strane 71 píšete: „Je zde velká interference použité značky a ani jeden z modelů nesplňuje předpoklady pro využití.“ Na základě čoho usudzujete, že ide o veľkú interferenciu fluoroforu/quencheru?
25. Na strane 73 píšete: „Cílem této diplomové práce bylo analyzovat možnou závislost mezi plochou píku a koncentrací stanovovaných oligonukleotidů a duálně značených sond...“ Vo všetkých uvádzaných grafoch popisujete závislosť absorpcie vynásobenej objemom, vysvetlite.
26. Na strane 73 píšete: „Dále by bylo vhodné pokrýt širší pásmo obsahu GC bází pro jednu délku oligonukleotidu, tedy ideálně 0-100 % GC pro každou analyzovanou délku...“ Mohli byť do analýzy zahrnuté vzorky s obsahom GC 100 %?
27. U konštatovaní o umelej inteligencii a strojovom učení by bolo vhodné uviesť odkazy na literatúru.

Napriek vyššie uvedeným pripomienkam a komentárom bol cieľ diplomovej práce splnený a preto ju odporúčam k obhajobe. Avšak, vzhľadom na nízku úroveň spracovania a vyššie uvedené skutočnosti ju hodnotím

E.

Mgr. Filip Kostelanský, Ph.D.

