

## Oponentský posudek k diplomové práci

### **Syntéza imunofluorescenčních sond pro analýzu významných biologických molekul Bc. Aneta Šmerdová**

Diplomová práce o rozsahu 106 stran se zabývá optimalizací syntézy fluorescenčních sond pro analýzu biologických vzorků. Jako fluorofory byly použity CdTe kvantové tečky a fluorescein. Syntéza fluorescenčních sond byla kontrolována pomocí kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.

V teoretické části o rozsahu 29 stran jsou vysvětleny principy fluorescence, kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. Je zde také vypracován přehled fluorescenčních sond a metod přípravy kvantových teček a jejich konjugace s dalšími molekulami.

Experimentální část na deseti stranách popisuje použité přístroje, přípravu roztoků, syntézu fluorescenčních sond a konjugaci proteinů a protilátek s fluorofory a konjugaci dvou proteinů. Kapitola Výsledky a diskuze (50 stran) obsahuje separace kvantových teček od zbytků reakční směsi pomocí gelové permeační chromatografie, přípravu fluorescenčních sond různými konjugačními reakcemi, jejich optimalizaci a sledování pomocí kapilární elektroforézy. Další velkou rozsáhlou částí je seznámení s metodou hmotnostní spektrometrie a její využití pro kontrolu konjugačních reakcí myoglobinu s fluoresceinem a s glutathionem a optimalizaci podmínek syntézy. V závěru této kapitoly je aplikace připravené fluorescenční sondy na reálný biologický vzorek. Naměřená experimentální data jsou nedostatečně diskutována a komentována a v textu nejsou odkazy na obrázky a tabulky. V Závěru studentka shrnula všechny provedené experimenty a jejich výsledky. Chybí mi však obecnější závěry a poznatky vyplývající z naměřených dat.

Diplomová práce obsahuje 48 literárních odkazů. Z toho 40% tvoří odkazy na internetové stránky. Jsou to zejména odkazy na výrobce fluoroforů a jejich internetové katalogy s vlastnostmi a charakteristikou nabízených produktů a vysokoškolská skripta zpřístupněná jejich autory ve formátu pdf, což je v souladu se současným trendem. Jako problematické bych označila odkazy na otevřené internetové encyklopedie, kde není zaručena správnost informací (např. citace 45). Dále bych předložené diplomové práci vytkla nedodržování citačních norem, kdy je uváděn pouze první autor a u několika citací chybí některé bibliografické údaje.

Předložená diplomová práce splňuje cíle stanovené v jejím zadání a je zpracována na úrovni znalostí studenta magisterského studia. Práce obsahuje velké množství překlepů, gramatických a formálních chyb. V práci není dodržováno jednotné označování jednotek,

například molární koncentrace je uváděna v jednotkách M, mol/l nebo není uvedena vůbec, a veličin, například pro kvantový výtěžek je na straně 16 použit symbol  $q_F$  a na straně 17  $\Phi$ . Je často používán laboratorní slang a anglické termíny (např. triplexový stav, kadmium telurid).

Další připomínky a dotazy:

Str. 12 – Uvádíte, že luminiscence se dělí na fluorescenci a fosforescenci. Jaké jsou další druhy luminiscence?

Str. 25 – Uvádíte, že smícháním roztoků  $CdCl_2$  a kyseliny 3-merkaptopropionové vznikne prekurzor kyanidového roztoku.

Str. 27 – Opakuje se celý odstavec.

Str. 28 – Popis orientované vazby s fluorescenční látkou není jasný a kompletní, mohla byste ho upřesnit?

Str. 31 – V kapitole 2.5.2. Elektroosmóza popisujete vznik elektroosmotického toku a mimo jiné uvádíte, cituji: „Ke stěně je přitažena vrstva kladně nabitých kovových iontů z pufru.“ Mohla byste upřesnit o jaké kovové ionty se jedná?

Str. 44, kapitola 4.3.1.3. – U přípravy roztoku kvantových teček není uveden objem pufru, ve kterém byly rozpuštěny.

Str. 44, kapitola 4.3.1.4. – Roztok jakého proteinu byl připraven? Cituji: „Připravila jsem si zásobní roztok myoglobinu (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci  $5,89 \cdot 10^{-4}$  mol/l. V 1 ml 0,1 M fosfátového pufru jsem rozpustila 10 mg ovalbuminu (Sigma-Aldrich, USA).“

Str. 46 – V popisu aparatury pro kapilární elektroforézu uvádíte, cituji: „Fluorescenční signál prochází přes optické filtry (Oriel, Newport, USA) do mikroskopového objektivu (Orel, USA) a je detekován pomocí fotonásobiče (Hamamatsu, Japonsko) a zpracován zařízením pro sběr a vyhodnocení signálu (CSV, DataApex Dobřichovice).“ Mohla byste uvést správné pořadí optických prvků?

Str. 55 – V kapitole 5.2.1.2. uvádíte, že větší roli než zkoumaný vliv teploty měla koncentrace reaktantů. Proč nebyly koncentrace pro všechny reakce stejné?

Str. 59 – V popisku obrázku 32 je uvedeno číslo vzorku 1 místo 2.

Str. 61 - Odkaz na obrázek 36 místo 34.

Str. 65 – Tabulka 7 a následně také 9 a 11 je pojmenována jako Popis vzorku myoglobinu pomocí vzorce. Mohla byste uvést jaký vzorec popisuje tyto tabulky?


Str. 69 – V textu je uveden odkaz na obrázek 39 místo 40.

Str. 75 – Píšete, cituji: „Při jednadvacetinásobné nadbytku FITC roste množství nezreagovaného FITC, který se ionizuje více než myoglobinu. Díky vysoké ionizaci FITC jsem schopna z obr. 48 určit obálky konjugátu.“ Mohla byste tento zajímavý jev blíže vysvětlit?

Str. 98 – Píšete, že v obrázku 65 jsou zřetelné obálky proteinů myoglobinu a transferinu, zatímco po jejich konjugaci je pozorována pouze jediná obálka – obrázek 66. Tento obrázek má však osu x pouze do  $m/z$  asi 1900, zatímco obálka transferinu byla naměřena až při  $m/z$  asi 2500.

Studentka prokázala schopnost řešit zadaný úkol, výsledky zpracovat a prezentovat písemnou formou. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení: 2

V Brně dne 20.5.2010

  
Mgr. Ivona Voráčková, Ph.D.