

Optimalizace preanalytické úpravy vzorků pro analýzu fosfopeptidů pomocí CZE

V předložené diplomové práci se diplomantka v souladu se zadáním zabývala optimalizací kroků přípravy vzorků pro následnou analýzu fosfopeptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) ve spojení s UV detekcí. Jako modelový fosfoprotein, na kterém byly testovány postupy úpravy vzorku, byl vybrán α -kasein, který byl proteolyticky štěpen. Další úpravy spočívaly v obohacení fosfopeptidů a jejich defosforylaci tak, aby porovnáním získaných elektroforegramů vzorku před a po defosforylaci bylo možné usuzovat na přítomnosti fosforylace, což by přispělo ke zvýšení potenciálu použitelnosti CZE při analýze fosfoproteinů v reálných vzorcích včetně komplexních směsí.

V přiměřeně rozsáhlé teoretické části diplomantka popsala principy CZE a MS a jejich instrumentaci. Dále se stručně věnovala obecné charakteristice proteinů včetně popisu fosforylace jako nejčastěji se vyskytující posttranslační modifikace proteinů. Na závěr pak shrnula některé dosud publikované výsledky o využití CZE a dalších technik pro analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů a detailně popsala možné preanalytické fáze úpravy a způsoby obohacování vzorků fosfopeptidů.

V rámci experimentálních prací diplomantka zpracovala modelové vzorky podle navržených preanalytických úprav, které zahrnovaly štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických mikročasticích ve dvou různých prostředích, obohacení získaných fosfopeptidů na TiO_2 časticích a v neposlední řadě i defosforylaci fosfopeptidů pomocí alkalické fosfatázy, imobilizované na magnetických mikročasticích, kdy byla provedena optimalizace postupu defosforylace. Připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí CZE a navíc byly všechny kroky úpravy modelového vzorku ověřovány pomocí MALDI-MS za účelem získání doplňujících informací o připravených vzorcích. Získané výsledky pak diplomantka přehledně zpracovala formou obrázků, grafů i tabulek a diskutovala je v přiměřeně rozsáhlé výsledkové části práce.

Slečna Konečná po celou dobu pracovala na své diplomové práci velmi svědomitě a samostatně a prokázala potřebnou zručnost nejen při obsluze přístroje pro CZE, ale zejména při vlastní přípravě vzorků naštěpeného α -kaseinu pro MS analýzy a elektroforetické separace. Veškeré pracovní postupy si velice rychle osvojila a přitom k nim přistupovala s maximální pečlivostí.

Z pohledu vedoucího diplomové práce nemám k řešeršší a experimentální práci diplomantky žádné připomínky, stejně tak ani k předložené diplomové práci, která je sepsána přehledně a srozumitelně. Snad bych jen podotknul, že mohla být věnována větší pozornost opravě překlepů. Přesto mohu konstatovat, že Michaela Konečná splnila zadání diplomové práce, kterou hodnotím známkou

- výborně -.

