

## Oponentský posudek na diplomovou práci Ivana Petříka

### Název práce: Optimalizace protokolu extrakce a štěpení rostlinných proteinů před LC-MS analýzou

V předložené diplomové práci jsou optimalizovány metody přípravy rostlinných vzorků pro analýzu proteinů pomocí LC-MS/MS. V jednotlivých optimalizačních krocích jsou porovnány výsledky dosažené po odstranění sekundárních metabolitů, extrakci a precipitaci proteinů v různých roztocích. Důraz je kladen na jejich vzájemnou kompatibilitu a vhodnost použití pro následnou analýzu proteinů pomocí LC-MS/MS. V práci je využito dvou různých metod štěpení (ve zkumavce a na centrifugačním filtru) před samotnou identifikací proteinů na hmotnostním spektrometru. Pozornost je také věnována identifikaci fosfoproteinů zkoumanými metodami ve spojení s afinitní chromatografií na oxidu titaničitém.

Diplomová práce je členěna do tří kapitol, kterým předchází stručný popis cílů práce. Na 15 stranách teoretické části jsme uvedeni do problematiky proteomiky rostlin a jednotlivých metod, jež jsou používány pro identifikaci proteinů. Text se v souladu se zaměřením celé práce zabývá teoretickým výkladem a problémy metodiky, přesto nechybí odkazy na literaturu, kde jsou probírané metody využity při zkoumání rostlinného proteomu. V Experimentální části jsou nejprve podrobně popsány použité metody a následně na 18 stranách jsou diskutovány dosažené výsledky práce doplněné grafy a obrázky. Vše je shrnuto v Závěru, kde je také výčet celkového množství spotřebovaného rostlinného materiálu a peptidové směsi HeLa, počtu provedených separací a replikátů.

V textu je výskyt formálních chyb a různých nepřesností minimální. Např. zkratka FASP je v textu vysvětlena několikrát (str. 36, 52, 54). Na str. 62 jsou tři citace bez čárky mezi jménem autora a rokem, jak je to v ostatní části textu zvykem. Slova kompetují a bovinní bych v češtině raději nahradil jinými slovy. Pozor také na metody, které při práci používáme, resp. obrat použitý v textu. Nemí možné změřit objem vzorku pipetou.

Téma diplomové práce považuji za aktuální, LC-MS/MS nabízí rychlou a velmi účinnou možnost charakterizace proteinů. Přičemž příprava vzorku (extrakce, proteolytické štěpení proteinů) je pro úspěch klíčová. Závěry práce budou podle slov autora dále využity při studiu rostlinných proteinů. Mohou také sloužit dalším laboratorům při optimalizaci metod spojených s identifikací proteinů pomocí LC-MS/MS. Student splnil vytyčené cíle diplomové práce. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou.

Otázky k zamyšlení a případné odpovědi:

1. V teoretické části (str. 16) je psáno, že k tandemové hmotnostní spektrometrii je zapotřebí dvou analyzátorů. Je možné využít pro MS/MS také jeden hmotnostní analyzátor?
2. Je krok odsolení po afinitní chromatografii na oxidu titaničitém potřebný?
3. Na straně 55 je při porovnání počtu identifikovaných proteinů a peptidů jednotlivými metodami psáno, že rozdíl nebyl staticky významný. Byla statistická významnost testována? A pokud ano, jaká metoda byla pro testování použita?

V Olomouci, dne 17. srpna 2015

Filip Dyčka