



Posudek bakalářské diplomové práce Lucie Hrubcové

Metody dekontaminace rekombinantních proteinů od bakteriálního lipopolysacharidu.

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař Ph.D.

Oponent: RNDr. Zdeněk Franta Ph.D. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Předložená bakalářská práce Lucie Hrubcové se zaměřuje na problematiku odstranění bakteriálního lipopolysacharidu ze vzorků rekombinantních proteinů. Bakteriální expresní systém je hojně využíván pro produkci rekombinantních proteinů a odstranění lipopolysacharidů ze vzorků je nezbytné pro následné imunologické studie. Práce je sepsána na 49 stranách a je rozdělena na úvod (11 stran), cíle práce, Materiál a metody (8 stran), výsledky (19 stran), diskuzi (4 strany), závěr, seznam zkratek a literaturu.

Úvod práce je zároveň i rešerší na téma lipopolysacharidů a jejich dekontaminace z biologických vzorků. Autorka zde, dle mého názoru, dobře pracovala s literaturou a zadané téma je poměrně dobře zpracováno. Kvalitu úvodu mírně snižuje špatná kvalita použitých obrázků, které jsou poměrně rozmazané (Obr 1, 3, 4). Čtenář je po přečtení úvodu seznámen s řešenou problematikou i jednotlivými postupy pro odstranění LPS.

V kapitole materiál a metody autorka popisuje jednotlivé kity pro dekontaminaci a detekci LPS v biologickém vzorku, které použila během své bakalářské práce. Tato kapitola je dle mého názoru sepsána až moc detailně, čímž se stává nepřehlednou a informace o jednotlivých postupech se ztrácí. Pro příště bych autorce doporučil, že postačí, pokud uvede: že vzorek ředila dvojkovou řadou a nemusí uvádět přesně, kolik mikrolitrů smíchala, či že postupovala podle doporučeného manuálu výrobce a neopisovala celý manuál.

Získané výsledky jsou prezentovány formou 14 tabulek a 4 grafů. Jelikož se jedná o metodickou práci, autorka zde porovnává jednotlivé kity na předem připravených standardech. Prezentované výsledky naznačují určitý trend dekontaminace jednotlivých vzorků, ale pro komparativní studii bude zapotřebí je zopakovat s provedením lepších kalibračních křivek a kontrol.

Diskuze je sepsána jasnou formou. Autorka zde konzultuje získané výsledky s dostupnou literaturou, srovnává výhody a nevýhody jednotlivých kitů a navrhuje "optimální postup" pro dekontaminaci vzorků od LPS v laboratoři.

Dotazy a komentáře na autorku:

1: V úvodu píšete, že jednou z metod pro odstranění LPS ze vzorku je gelová chromatografie. Bohužel jsem se nikde nedočel, jak velký LPS je. Mohla byste mi to specifikovat?

2: v kapitole 3.2.3 píšete, že jste upravovala hodnotu pH u PBS pomocí 0.1M NaOH a 0.1M HCl na hodnotu cca 7.5, neboť rozmezí mezi pH 7-8 je optimální pro vazbu LPS na



polymyxin B. PBS je fyziologický roztok, který má standardně hodnotu 7.2 či 7.4 a tudíž může být využit bez nutnosti úpravy pH. Proč jste přistoupila k úpravě hodnoty pH? A na jakou přesnou hodnotu bylo pH upraveno?

3: Můžu se zeptat, v jakých technických replikátech byly prováděny kalibrační křivky? (obr. 7, 8, 9, 10)

4: proč byly kalibrační křivky prováděny jen do hodnoty 1EU? Spousta vašich měření je mimo kalibrační křivky a tudíž může být vypočtená hodnota nepřesná (např. Tabulka 4, u vzorku s koncentrací 5EU byla vypočítána hodnota 9.3EU)

5: Zaujalo mě, že u kontrolního vzorku bez LPS byla naměřena hodnota 1.640 (tab. 4). Bylo toto měření opakováno?

6: z prezentovaných dat mi není úplně jasné, jak byly jednotlivé hodnoty EU získávány. Co je kontrolní vzorek? Já bych za kontrolní vzorek považoval vzorek bez LPS.

7: v tabulce 10 máte naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky, zde mě zaujalo, že naměřená hodnota pro vzorek bez LPS je vyšší než hodnota testovaného vzorku i když po dekontaminaci.

Závěrem bych chtěl říci, že navzdory všem mým dotazům a připomínkám, předložená bakalářská práce Lucie Hrubcové **splňuje** veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU a tudíž ji doporučuji k obhajobě

V Českých Budějovicích, 08.07.2020

Zdeněk Franta