



ÚSTAV CHEMIE

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Kotlářská 2, Brno, CZ-611 37, Česká republika



Oponentský posudek disertační práce

Věra Hezinová se ve své disertační práci „Development of instrumentation and methodology in proteomic and environmental analysis“ zabývala vývojem spojených elektromigračních technik s hmotnostní spektrometrií a jejich využitím v bioanalytické chemii.

Předkládaná anglicky psaná práce o 194 stranách spolu s 273 literárními odkazy, 108 obrázky a 23 tabulkami je rozvržena do několika oddílů. V úvodu a teoretické části (celkem 57 stran) je podán stručný výklad teoretických a praktických aspektů luminiscence včetně fluorescenčních značek a sond – organických molekul a anorganických nanočástic s důrazem na kvantové tečky (QD's). Dále je v této kapitole vysvětlena chemie konjugace protilátek s fluorescenčními sondami a jejich aplikace v CE a fluorescenční mikroskopii. Další kapitola je věnována výkladu základů proteomiky, která zahrnuje přípravu vzorku a vícerozměrné separační techniky, kde je velký důraz kladen na techniku CE-MS po všech stránkách včetně vývoje rozhraní (“interface”) pro spojení obou technik a popisu zlepšení jejich účinnosti. Jako příklad proteomické studie byly vybrány karotenogenní kvasinky studované pod stresem, což je popsáno v poslední kapitole.

V experimentální části autorka popisuje přípravu nanočástic typu kvantových teček, jejich charakterizaci, popis konjugačních experimentů, postupy proteomické analýzy, která zahrnuje CE-MS experimenty a předúpravu vzorku pomocí SPME. V této části je také popsán bioanalytický postup stanovení metabolitů ethanolu a kokainu.

V kapitole Výsledky a diskuse autorka popisuje fyzikálně-chemické vlastnosti a charakterizaci připravených QD nanočástic (luminiscenční spektra, poločas vyhasínání luminiscence, HRTEM). Pro optimalizaci konjugačních experimentů s látkami biologického původu (anti-ovoalbumin, annexin V, oxidovaný glykan) za účelem syntézy imunoluminiscenčních sond byla použita kapilární a gelová elektroforéza s detekcí pomocí laserem-indukované luminescence. Přístup byl ověřen na syntéze duální sondy s luminiscenčními a magnetickými vlastnostmi. Dále byla testována vizualizace *in vivo* pro modelové bioanalytické experimenty s použitím připravených sond a následnou detekcí pomocí

epifluorescenční spektroskopie. Proteomické experimenty s karotenogenními kvasinkami byly prováděny pomocí 2D gelové elektroforézy s následnou LC-MS-MS detekcí.

Autorka se pokusila shrnout a interpretovat své zajímavé experimentální výsledky, včetně těch neúspěšných, což považuji za klad celé práce. Práce je psána na velmi slušné úrovni v anglickém jazyce, ačkoliv po formální stránce se v práci nachází několik překlepů a zdvojených citací (např. překlepy na str. 59, zdvojené reference [20] a [23]). Také bych vytknul neúplné až nevhodně dlouhé názvy časopisů bez použití běžně používaných zkratk. Z výsledků je patrné, že studentka zvládla velmi dobře pracovní problematiku na úrovni, jež ji poskytlo pracoviště Ústavu analytické chemie AV ČR, které dosahuje vynikajícího mezinárodního renomé v oblasti bioanalytické instrumentální chemie. Výsledky uvedené v disertační práci jsou součástí 3 publikací (jedna v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, dvě v *Electrophoresis*). Studentka je současně spoluautorkou dalších 3 publikací, které nejsou zahrnuty v práci. Domnívám se, že nároky kladené na diplomovou práci byly splněny, proto ji doporučuji k obhajobě.

Brno 6.12.2011

doc. RNDr. Přemysl Lubal, Ph.D.

Dotazy:

Kvantové tečky:

- Jaký je kvantový výtěžek QD-nanočástic? Jaký trend byste očekávala pro částice jednotlivých velikostí? Jaké problémy musíte vyřešit pro stanovení tohoto parametru? Jak byste postupovala, abyste změřila tento významný parametr fluoreskujících molekul? Jsou QD's vhodné pro FRET aplikaci? Pokud ano, tak jaký postup byste zvolila?

Stanovení kokainu a jeho metabolitů:

- Proč jste pro simulaci separace směsi těchto látek použila software pro predikci jejich disociačních konstant, který je zatížen velkou chybou? Navíc byla použita stejná hodnota mobility pro všechny analyzované látky, což simulaci značně znehodnocuje. Jak byste mohla jednoduše odhadnout oba fyzikálně-chemické parametry (mobilita jednotlivých species, pK_a) z Vašich experimentálních dat? Jak funguje simulační software pro simulaci ITP, ev. CZE záznamů?
- Co je špatně na tvrzení „These compounds are positively charged approximately at pH = 7 and higher.“ (str. 161)?
- V poslední době se objevilo několik dalších prací na podobné téma z oblasti toxikologické analýzy metabolitů ethanolu a kokainu. Můžete podle analytických, event. ekonomických parametrů (mez detekce, pracovní rozsah, robustnost, citlivost, cena a doba analýzy, aj.) odhadnout a porovnat jednotlivé postupy včetně Vámi vyvinutých metod?
- Proč nejsou uvedeny odhady neurčitostí parametrů kalibrační přímky? Bylo testováno, zda se kalibrační přímka významně odchyluje od nuly? Pokud ano, jak vysvětlíte, že v některých případech kalibrační závislost vykazuje zápornou a v jiných případech kladnou hodnotu?
- Proč nejsou v celé práci uvedeny pro porovnání účinnosti optimalizace celého separačního procesu při změně jednotlivých experimentálních podmínek (změna kapiláry, změna složení rozpouštědla, aj.) parametry charakteristické v HPLC, např. výškový ekvivalent teoretického patra?
- V celé své práci jste používala CE-MS nebo event. tITP-CE-MS. Jaké výhody by mohla event. přinést metoda ITP-MS pro bioanalytické stanovení metabolitů?
- Pro nastavení pH v širokém rozmezí byl použit mravenčan amonný? Je to možné?