

Posudek diplomové práce pana

Richarda Chudoby

“Elektroforetická separace normální a mutantní DNA za podmínek částečné denaturace”

Předložená diplomová práce se zabývá vysoce aktuálními vědeckými problémy: termodynamikou disociace krátkých úseků DNA a teoretickými principy instrumentace pro jejich elektroforetickou separaci. Dokonalé porozumění oběma problematikám je základním předpokladem vývoje nové metodiky a vysoce výkonné instrumentace pro rychlou detekci mutací v klinických vzorcích genomové DNA onkologických pacientů.

Po stránce formální je práce zpracována velmi dobře. Teoretické i experimentální výsledky jsou adekvátně prezentovány v tabulkách, obrázcích a grafech. Textová část je napsána přehledně a srozumitelně, kultivovanou češtinou. Poněkud uspěchaná vymezení některých důležitých pojmu a formulace řešených problémů jsou však na úkor srozumitelnosti textu při jeho prvém čtení. Například některé nevysvětlené pojmy uvedené ve velmi stručném abstraktu jako: “vzájemné mobility homoduplexních a heteroduplexních fragmentů”, “transformační funkce pro vyhodnocování elektroferogramů z multikapilárního pole” a “teplotní mapa multikapilárního pole” činí abstrakt pro nezasvěceného čtenáře málo srozumitelný. Výbrady mám také k nadbytečnému používání slovesa „provádět“. Daleko lépe zní: „detektovat“, „separovat“ než „provádět detekci“ nebo „provádět separaci“. Snadný překlad anglických názvů jako SSCP, CGCE atd. do češtiny by působil v českém textu lépe.

Rovněž po stránce obsahové je práce kvalitně zpracována jak v části rešeršní, tak výsledkové. Teoretické výsledky výpočtu termodynamických dat dignosticky významných fragmentů DNA jsou účelně korelovány s výsledky denaturační kapilární elektroforézy. Vytčené cíle byly splněny. Za nejvýznamnější přínos práce považuji nalezení shody teoretických závěrů s reálným chováním částečně denaturowaných fragmentů jak v případě homoduplexů, tak heteroduplexů. Dobré znalosti prokázal autor i v oblasti statistické interpretace nalezených dat

Závěr:

Konstatuji, že předložená diplomová práce dokazuje, že její autor ovládá teoretické principy studované problematiky, zvládnul náročnou instrumentaci a prokázal experimentální zručnost. Diplomová práce splňuje všechny stanovené podmínky a doporučuji ji k obhajobě.

Dotazy:

Vzhledem k některým nepřesným formulacím mám na uchazeče následující dotazy, jejichž zodpovězení nijak neovlivní výše uvedené závěry.

- 1) Na straně 13 v části 2.2.4 Single-strand conformation polymorphism uvádíte: „...fragmenty s různou sekvencí v místě SNP či bodové mutace se oddělí během gelové elektroforézy v nedenaturujícím prostředí v důsledku rozdílných hodnot efektivních průměrů.

Máte na mysli efektivní průměr hydrodynamicky ekvivalentní koule? Potom by tedy bylo možné separovat tyto fragmenty i ve volném elektrolytu. Posuďte, za jakých podmínek by se daly separovat fragmenty DNA podle velikosti jejich řetězce ve volném elektrolytu, tedy v kontinuu bez přítomnosti molekul neutrálního polymeru?

- 2) Na straně 16 v části 2.2.7 Denaturant capillary electrophoresis je uvedeno: "Jako separační matrice se při DCE metodách používá lineární (nezesítovaný) polyakrylamidový gel v kapilárách."

To je protimluv. Vysvětlete pojmy sol, fyzikální a chemický gel a popište charakter migrace fragmentů DNA v těchto separačních prostředích.

- 3) Pojem „helicita“ (Φ), jako míra spárování dvou vláken dvoušroubovice DNA, se snad nepoužívá ani ve vědeckém žargonu. Helikální strukturu mají i proteiny, polysacharidy a jiné jednořetězcové molekuly. Navrhoji tedy používat spíše pojem míra asociace dvouřetězcové DNA.

Vysvětlete důvod použití tohoto pojmu.

V Brně 10. května 2007

Ing. Karel Klepárník, CSc.
Ústav analytické chemie AVČR
Brno