

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Смирновой Дарьи Васильевны «Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrellica* и их биоаналитическое применение», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Люцифераза светляков – фермент, катализирующий химическую реакцию, в которой происходит высокоэффективная генерация электронно-возбужденного продукта и, далее, испускание им света (биолюминесценция) в видимой области спектра (540-600 нм). Высокая специфичность фермента и легкость фотометрической регистрации яркой биолюминесценции обуславливают аналитические применения люциферазы светляков (различные варианты биолюминесцентного анализа). Наиболее широко люцифераза применяется в методах, основанных на определении АТФ, т.е. в «видимой быстрой микробиологии», которая позволяет в десятки раз сократить длительность детектирования микробных или соматических клеток.

Актуальной задачей является создание новых высокочувствительных и высокоспецифичных реагентов для биолюминесцентного определения нанокolicеств различных физиологически активных веществ и патогенных микроорганизмов. Такими реагентами, например, могут быть бифункциональные молекулы на основе люциферазы, совмещающие в себе высокую чувствительность фермента-детектора и высокую селективность компонента, способного связываться с изучаемой мишенью.

Бифункциональные молекулы создают экспрессией генно-инженерных конструкций, позволяющих получать гибриды заданного состава с сохранением специфических и биолюминесцентных свойств. Наибольший интерес представляют биотин- и стрептавидин-люциферазы, позволяющие фиксировать молекулу люциферазы на поверхности мишени путем высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий. Задачи получения, исследования и аналитического применения гибридных белков на основе люциферазы светляков и были поставлены и решены в диссертации Д.В. Смирновой

Диссертация построена по правилам ВАК и включает 140 страниц машинописного текста, которые содержат введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (204 источника), 63 рисунка и 19 таблиц.

В обзоре описана люциферин-люциферазная система светляков и обсуждаются ее биоаналитические применения. Показано, что ряд важных аспектов проблемы пока еще недостаточно развит - в частности, не ясны особенности этого уникального фермента как маркера в иммуно- и ДНК-анализе.

Далее рассмотрены методы получения бифункциональных молекул на основе люцифераз и фотопротеинов с использованием генетической инженерии или биоорганического синтеза.

Особое внимание в обзоре уделено биоаналитическим методикам, чувствительность которых резко повышена из-за того, что биолюминесценция усилена за счет безызлучательного переноса энергии от хемивозбужденной молекулы (донора энергии) к специально вводимому эффективному люминофору (акцептору энергии), например, флуоресцентному белку или красителю, который становится эмиттером излучения.

Отметим, что хемилюминесценция, усиленная («активированная») акцепторами-люминофорами («activated or enhanced chemiluminescence»), с 1960-х гг. успешно используется в исследованиях кинетики окисления более простых органических веществ (см. Vasil'ev, R.F. Secondary processes in chemiluminescent solutions, *Nature*, 1962, 196, No 4859, 668; Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А. Об усилении хемилюминесценции добавками люминесцирующих веществ, *Ж. физ. химии*, 1962, 36, №8, 1799). Несомненно, что аналогичный подход, обозначенный диссертантом как BRET (биолюминесцентный резонансный перенос энергии), оказывается полезным и при изучении сложных биологических систем.

Экспериментальная часть диссертации содержит подробное описание всех веществ, методов получения генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридные белки люциферазы, методы синтеза конъюгатов люциферазы с прогестероном и конъюгатов антител с красителем. Детально описаны методы оптимизации состава реакционных сред, методики определения аналита. Эта часть диссертации имеет большое методическое значение для исследователей, работающих в области биоспецифического биолюминесцентного анализа.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из четырех глав. Первые три посвящены получению и применению гибридных белков люциферазы с биоспецифическими молекулами — биотином и стрептавидином, которые способны к образованию очень прочных комплексов. Именно поэтому биотин-стрептавидиновые взаимодействия являются основой многих биоспецифических методов анализа. Успех этой части работы был определен использованием гена мутантной термоустойчивой высокоактивной люциферазы (метод, разработанный ранее в лаборатории, в которой выполнялась рассматриваемая диссертация).

В первой главе описано получение гибридного белка люциферазы с биотин-связывающим доменом, при экспрессии которого с высоким выходом нарабатывается биотинилированная люцифераза.

Во второй главе представлено конструирование трех различных плазмид, кодирующих гибридный белок люцифераза-стрептавидин. До исследований Д.В. Смирновой была опубликована только одна работа, в которой с низким выходом был получен аналогичный гибридный белок, однако не была исследована его олигомерная структура. Поскольку

стрептавидин склонен к образованию олигомеров, различающихся по активности и сродству к биотину, то диссертантом было подробно изучено влияние структуры плазмиды на состав и свойства получаемого гибридного белка. Это позволило выбрать оптимальный продуцент для гибридного белка люцифераза-стрептавидин, который содержал максимальное количество тетрамера с высокой люциферазной активностью и высокой способностью к связыванию биотина. Этот гибридный белок и был успешно применен для специфического детектирования микробных клеток в двух форматах: 1) в иммуноанализе клеток сальмонеллы с использованием биотинилированных антител; 2) для детектирования биотинилированной ДНК, полученной при амплификации фрагмента гена, специфического для клеток *E. coli*.

Далее рассмотрены различные аспекты применения люциферазы светлячков в сочетании с явлением безызлучательного переноса энергии. Данная область пока еще мало разработана, поэтому результаты Д.В. Смирновой можно считать основополагающими. Для оптимизации переноса энергии методом генетической инженерии диссертант получила новый мутант люциферазы с максимумом спектра биолюминесценции при 550 нм, в то время как максимум биолюминесценции исходной термоустойчивой мутантной люциферазы расположен при 590 нм. Это позволило увеличить перекрывание спектров, сблизить уровни энергии донора и акцептора, повысить эффективность переноса энергии и, таким путем увеличить отношение сигнала к шуму.

Д.В. Смирнова сконструировала новую BRET-систему для гомогенного иммуноанализа модельного антигена - прогестерона. Она включает люциферазу, химически конъюгированную с прогестероном (Luc-Pg - донор), и антитела, ковалентно связанные с люминофором (Ab-AF - акцептор). В отсутствие антител спектр биолюминесценции принадлежит исключительно люциферазе. При добавлении Ab-AF образуется специфический комплекс Luc-Pg...Ab-AF, в котором происходит перенос энергии. Интенсивность биолюминесценции люциферазы уменьшается, и появляется спектр флуоресценции акцептора.

Автор разработала высокоэффективные методы получения конъюгатов люциферазы с прогестероном (Luc-Pg) и антител к прогестерону с люминофором Alexa-Fluor 610-х (Ab-AF), которые обладают высокой специфической активностью и сохраняют биохимические и физико-химические свойства исходных реагентов. Оптимизированы состав пары конъюгатов Luc-Pg и Ab-AF, найдены условия высокой эффективности переноса энергии. Проведен тщательный, многофакторный анализ системы донор + акцептор + определяемый анализ: зависимостей от концентраций каждого из компонентов, состава реакционной среды, температуры, длительности инкубации - с целью нахождения оптимальных условий для достижения максимальной интенсивности свечения, наиболее широкого динамического диапазона определения анализа при сохранении высокой чувствительности анализа.

Диссертантом разработан высокочувствительный метод гомогенного иммуноанализа прогестерона; из-за малой трудоемкости он позволяет значительно сократить длительность анализа по сравнению с гетерогенным иммуноферментным анализом с применением тех же конъюгатов Luc-Pg. Эта часть работы заслуживает самой высокой оценки.

Достоверность и надежность полученных Д.В. Смирновой результатов подтверждается использованием современных инструментальных и биохимических методов исследования. Диссертация является большим, целостным и законченным исследованием, выполненным на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Содержание диссертационной работы с необходимой полнотой отражено в публикациях автора. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Текст диссертации написан ясно, рисунки и таблицы информативны, выводы хорошо аргументированы. Замечаний принципиального характера по диссертации не имею. Могу сделать лишь небольшие замечания, касающиеся языка изложения. В целом, язык диссертанта, безусловно, хороший и правильный, но следовало бы избегать отглагольных существительных (например, вместо «измерения, анализ и т.п. проводили» лучше просто писать «измеряли, анализировали и т.п.»). «Лишними» являются также слова «Установлено, что...», «Показано, что...» (в Выводах). Без них вполне можно было обойтись. Вместо «Лундиным» (фамилия, с. 15) следовало написать «Лундином» (аналогично, например, «с Чарли Чаплином», «с лордом Кельвином» и в т.п. случаях нерусских имен).

Эти замечания не затрагивают основные, качественные положения диссертации и не влияют на общую положительную оценку работы, которая, несомненно, нова, важна и интересна.

Результаты Д.В. Смирновой могут быть использованы на химическом и биологическом факультетах и на факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова, в Сибирском федеральном университете, в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, в Институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.

По актуальности, новизне и практической значимости, объему и достоверности полученных результатов, уровню решения поставленных задач диссертация Д.В. Смирновой «Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и их биоаналитическое применение» удовлетворяет всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», и является научно-квалификационной работой, в которой успешно решены задачи получения, исследования и аналитического применения гибридных белков на основе люциферазы

светляков, что является ценным вкладом в биохимию и биотехнологию и имеет важное значение для развития этих отраслей знания. Автор диссертации - Дарья Васильевна Смирнова, несомненно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Заведующий лабораторией фото- и хемиллюминесцентных процессов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук (ИБХФ РАН)  
доктор химических наук

Трофимов Алексей Владиславович

Подпись д.х.н. А.В. Трофимова заверяю  
Ученый секретарь ИБХФ РАН  
кандидат химических наук



М. М. Долгая

19 мая 2015 г.

Почтовый адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

E-mail: [ibcp@sky.chph.ras.ru](mailto:ibcp@sky.chph.ras.ru)

Телефон: (499) 137-64-20

## СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертационной работе Смирновой Дарьи Васильевны на тему: «Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светлячков *Luciola mingrelica* и их биоаналитическое применение», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности
Трофимов Алексей Владиславович	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Зав. лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов	Доктор химических наук	02.00.04 физическая химия

### Основные научные труды по теме диссертации:

1. Adam W., Bronstein I., Edwards B., Engel T., Reinhardt D., Schneider F.W., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. Electron exchange luminescence of spiroadamantane-substituted dioxetanes triggered by alkaline phosphatase. Kinetics and elucidation of pH Effects. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10400-10407.
2. Adam W., Bronstein I., Trofimov A.V. Solvatochromic effects on the electron exchange chemiluminescence (CIEEL) of spiroadamantyl-substituted dioxetanes and the fluorescence of relevant oxyanions. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 5406-5414.
3. Adam W., Matsumoto M., Trofimov A.V. Hydrogen-bonding effects on the fluorescence versus electron-transfer-initiated chemiluminescence spectra of the m-oxybenzoate ion derived from a bicyclic dioxetane. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 2078-2082.
4. Adam W., Trofimov A.V. The effect of meta versus para substitution on the efficiency of chemiexcitation in the chemically triggered electron-transfer-initiated decomposition of spiroadamantyl dioxetanes. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 6474-6478.
5. Adam W., Trofimov A.V. Contemporary trends in dioxetane chemistry. In: *The Chemistry of Peroxides* (Ed. Z. Rappoport), V. 2, Part 2, *Patai Series: The Chemistry of Functional Groups*, **2006**, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Chapter 15, 1171-1209.
6. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. Facile chemiluminescence assay for antioxidative properties of vegetable lipids: Fundamentals and illustrative examples. *Analyst* **2009**, *134*, 2128-2134.
7. Васильев Р.Ф., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б. Хемилюминесценция индола и его производных. *Успехи химии* **2010**, *79*, 91-103.
8. Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С., Наумов В.В., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б. Кинетика окси-хемилюминесценции этилбензола в присутствии антиоксидантов из тканей морского беспозвоночного *Eupentacta fraudatrix*. Оценка содержания и реакционной способности природных антиоксидантов. *Кинетика и катализ* **2014**, *55*, 157-162.
9. Palmina N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E., Kasparov V.V., Bogdanova N.G., Menshov V.A.,

Trofimov A.V. Effects of different phases of cigarette smoke on lipid peroxidation and membrane structure in liposomes. *Australian Journal of Chemistry* 2014, 67, 858-866.

Заведующий лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук (ИБХФ РАН)  
доктор химических наук

Трофимов Алексей Владиславович

*Подпись д.х.н. А.В. Трофимова заверяю*

Ученый секретарь ИБХФ РАН  
кандидат химических наук

*М.М. Долгая*



М.М. Долгая

19 мая 2015 г.

Почтовый адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

E-mail: [ibcp@sky.chph.ras.ru](mailto:ibcp@sky.chph.ras.ru)

Телефон: (499) 137-64-20