

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Смирновой Дарьи Васильевны
«Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и их
биоаналитическое применение», представленную на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальностям

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Одной из важнейших проблем современной биохимии и биотехнологии является создание новых аналитических систем, способных отвечать постоянно растущим требованиям медицины, экологии, санитарии и др. Перспективным является разработка систем с использованием светоизлучающих белков (люцифераз) в качестве репортерных молекул, которые обеспечивают высокую чувствительность анализа, просты и безопасны. Люциферазы светляков являются в буквальном смысле ярким представителем таких репортеров, поскольку обладают самым высоким квантовым выходом среди всех известных в настоящее время люцифераз и, как следствие, обеспечивают высокую чувствительность анализа на их основе. Необходимо отметить, что на сегодняшний день аналитический потенциал этих люцифераз далеко не исчерпан. В этом аспекте представленная диссертантом работа, направленная на создание биоспецифических производных люциферазы светляка *Luciola mingrelica*, актуальна и своевременна.

Рассматриваемая диссертация изложена на 140 страницах и содержит все необходимые разделы в соответствии с правилами ВАК: Введение, Обзор литературы, Экспериментальную часть (Материалы и методы), Результаты и обсуждение, Выводы и Список цитированной литературы.

В литературном обзоре представлен анализ современного состояния исследований по теме работы, он включает разделы, описывающие структуру и функционирование биолюминесцентной системы светляков, способы модификации люциферазы и применение биоспецифических производных (генетических гибридов или химических конъюгатов) в биоанализе. Отдельное место занимает раздел об аналитических системах на основе явления BRET. На основании анализа современного состояния проблемы диссертант сформулировала цель и задачи своей работы, что является логичным завершением этой главы.

В главе 3 – Материалы и методы – приведена экспериментальная часть работы с описанием использованных реагентов и методов. Данная часть работы написана исчерпывающе подробно, так что ее можно использовать в качестве протокола для проведения многих экспериментов. Обращает на себя внимание значительное количество и

разнообразие методов исследования, которыми владеет соискатель – от генетической инженерии, химического синтеза до молекулярного анализа и биофизических методов.

В главе 4 изложены и обсуждены полученные автором результаты экспериментальных исследований, направленных на создание систем биоспецифического биолюминесцентного анализа на основе люциферазы *L. mingrelica*.

По мнению оппонента, основными системными достижениями работы являются: получение и определение свойств ряда биоспецифических производных люциферазы *L. mingrelica* – гибридов со стрептавидином и биотин-связывающим сайтом, пригодных в качестве универсальных репортеров в анализе на основе стрептавидин-биотиновой системы, разработка способа химического синтеза активных конъюгатов люциферазы с низкомолекулярными соединениями, а также способа гомогенного иммуноанализа мишени на основе явления BRET.

Объем выполненных исследований вполне достаточен для кандидатской диссертации. Обширный комплекс использованных методов и оборудования характеризует диссертанта как высококвалифицированного специалиста в области биохимии и биотехнологии.

Выводы базируются на полученных автором экспериментальных результатах и полностью ими обоснованы. Положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, полностью обоснованы и доказаны в диссертации, а их достоверность не вызывает сомнений.

К работе имеются вопросы и замечания: 1) В Таблице 14 приведены свойства препаратов гибридных белков люцифераза-стрептавидин. Учтено ли при этом, что в некоторых препаратах находится значительное количество свободной люциферазы? 2) В результате исследования свойств гибридов люцифераза-стрептавидин разной структуры (разделы 4.2.1-4.2.3.) показано, что вариант H₆-SA-Luc является оптимальным для разработки аналитических систем на его основе. Однако далее в тексте автор называет его (его ли?) Luc-SA, что вносит некоторую неопределенность для читателя. По мнению оппонента, следовало более четко обозначить введение этого названия. 3) В подписи к рис. 33 перепутаны названия красного и зеленого вариантов люциферазы; на рис.34 приведена структура сукцинимидного производного красителя Alexa Fluor 610-x; имеются опечатки (напр., «Лэммли» пишется с 2-я буквами «м», стр. 58). Как можно видеть, замечания оппонента носят не принципиальный, а, скорее, рекомендательный характер.

В целом диссертационная работа представляет собой завершенное исследование, написана тщательно, оставляет приятное впечатление. В работе поставлены и решены следующие задачи: получены и изучены свойства ряда биоспецифических гибридных

белков люциферазы светляка *Luciola mingrelica* и показана их применимость как репортеров для высокочувствительного специфического биолуминесцентного анализа; разработан способ получения высокоактивных химических конъюгатов люциферазы *L. mingrelica* с низкомолекулярными соединениями; создана аналитическая система на основе явления BRET и продемонстрировано ее применение в гомогенном иммуноанализе модельной мишени.

Результаты работы вносят значительный вклад в развитие высокочувствительных и специфичных аналитических методов для современной биомедицины и биотехнологии.

Материалы работы опубликованы в достаточной степени. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Важность поставленных и решенных в диссертации задач, современный методический уровень их решения, высокая значимость работы позволяют сделать заключение, что данная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Официальный оппонент,
д.б.н., в.н.с.
ФГБУН Институт биофизики СО РАН

Л.А. Франк

Подлинность подписи
Л.А. Франк заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биофизики СО РАН, к.ф.-м.н.

Е.С. Задереев

12 мая 2015 года



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертационной работе Смирновой Дарьи Васильевны на тему: «Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *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
Франк Людмила Алексеевна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики Сибирского Отделения РАН, ведущий научный сотрудник	Доктор биологических наук	03.00.23 Биотехнология

Основные научные труды по теме диссертации:

1. E.V. Ereemeeva, Frank L.A., Markova S.V., Vysotski E.S. Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as N-terminal partner in the fusion proteins. Journal of SFU. Biology **4** (2010) 372-383
2. S.V. Markova, L.P. Burakova, L.A. Frank, S. Golz, K. A. Korostileva, E.S. Vysotski Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria* cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. Photochem. Photobiol. Sci., 2010, **9**, 757–765
3. L.A. Frank, Ca²⁺-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters. Sensors 2010, **10**, 11287-11300
4. V. V. Krasitskaya, S. I. Korneeva, A. N. Kudryavtsev, S. V. Markova, G. A. Stepanyuk, L. A. Frank. Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein from *Renilla* as an enzyme-dependent label for binding assay. Anal. Bioanal. Chem. 2011, **401**:2573–2579
5. A. N. Kudryavtsev, V.V. Krasitskaya, A.I. Petunin, A.Y. Burakov, L.A. Frank Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins. Anal. Chem. 2012, **V. 84**, 3119–3124
6. В.В. Красицкая, Л.П. Буракова, И.А. Пышная, Л.А. Франк. Выявление аллельных вариантов гена с помощью биолуминесцентных репортеров. Биоорг. химия 2012, **38** (3): 342-350
7. Markova S.V., Burakova L.P., Golz S., Malikova N.P., Frank L.A., Vysotski E.S. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca²⁺-regulated photoprotein. FEBS J. 2012. **V. 279**, No.5. P. 856-870
8. V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay // Anal. Methods. 2013, **V.5**. P 636–640
9. E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, L.A. Frank, A.J. Visser, W.J. Berkel, E.S. Vysotski Bioluminescent and spectroscopic properties of His-Trp-Tyr triad mutants of obelin and aequorin. Photochem Photobiol Sci. 2013. **V. 12** (6). P. 1016-1024.
10. E.V. Ereemeeva, L.P. Burakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank. Hydrogen-bond network between C-terminus and Arg from the first α -helix stabilizes a photoprotein molecule. Photochem. Photobiol. Sci., 2014, **13**, 541–547.
11. М.А. Vorobjeva, V.V. Krasitskaya, A.A. Fokina, V.V. Timoshenko, G.A. Nevinsky, A.G. Venyaminova, L.A. Frank RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis. Anal. Chem. 2014 **V. 86**, 2590-2594

12. В.В. Красицкая, Т.Н. Субботина, И.А. Ольховский, Л.А. Франк. Определение мутации Лейдена методом ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера с двойной билюминесцентной детекцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2013, №12, С. 26,39-40.

13. L.A. Frank, V.V. Krasitskaya Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2014 V. 144, 175-197.

14. L.P. Burakova, A.N. Kudryavtsev, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. Anal. Bioanal. Chem. 2015. DOI 10.1007/s00216-015-8710-6

Официальный оппонент,
д.б.н., в.н.с.
ФГБУН Институт биофизики СО РАН

Л.А. Франк

Подлинность подписи
Л.А. Франк подтверждаю:

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биофизики СО РАН, к.ф.-м.н.

Е.С. Задерсев

12 мая 2015 года



Почтовый адрес: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН
Тел.: 8 (391) 243-15-79

<http://www.ibp.ru>, e-mail: lfrank@yandex.ru

Подпись Задерсева Е.С.
Заверяю: Зав. канцелярией ИБФ СО РАН