

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биохимии им. А.Н.Баха
Российской академии наук

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2
Тел.. 954-52-83, факс: 954-27-32

18.05.2015 № 12304-2171-286

на № _____

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института биохимии им. А.Н. Баха

Российской академии наук (ИНБИ РАН),

член-корреспондент РАН



В.О. Попов

» мая 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН) –
на диссертационную работу Смирновой Дарьи Васильевны
«Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светлячков *Luciola mingrelica*
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)

Развитие аналитических технологий, применяемых в современной медицине, экологическом мониторинге, контроле потребительской продукции, обуславливает интерес к разработке и внедрению в практику новых методов высокочувствительной детекции биологически активных соединений. Особый интерес представляет характеристика новых ферментов – маркеров образующихся в ходе анализа специфических межмолекулярных комплексов. На сегодняшний день в биоаналитической практике доминирует крайне ограниченный ряд ферментных маркеров – пероксидаза, щелочная фосфатаза и др., имеющих, наряду с известными преимуществами, определенные ограничения. Из потенциальных альтернативных маркеров следует выделить люциферазу, позволяющую проводить биолюминесцентную детекцию меченых комплексов. Трансформация люциферазой люминола лежит в основе активно используемых высокочувствительных методов выявления АТФ. Однако в качестве метки для иммунологической и ДНК-диагностики люцифераза практически не охарактеризована.

Вышеизложенные соображения однозначно свидетельствуют об **актуальности темы исследования** Д.В. Смирновой, посвященного получению и биоаналитическому применению гибридных белков и конъюгатов на основе люциферазы.

Диссертация Смирновой Д.В. изложена на 140 страницах, включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть (описание реагентов, аппаратуры и методик проведения экспериментов), результаты и их обсуждение, выводы и список литературы (204 источника). Работа содержит 63 рисунка и 19 таблиц.

Вводная часть диссертации содержит все элементы общей характеристики исследования – рассмотрение актуальности темы работы, ее целей и задач, научной новизны, практической значимости, положений, описание апробации работы и подготовленных публикаций.

Литературный обзор включает рассмотрение люциферин-люциферазной системы светляков, реализованных с ее использованием аналитических методов, в том числе систем на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), работы по получению химических и рекомбинантных конъюгатов люциферазы и их аналитическому применению. Обзор достаточно полно отражает современное состояние работ по теме диссертации, решенные и нерешенные задачи, связанные с биоаналитическим применением люциферазы. Материал хорошо структурирован и четко изложен, представленные данные формируют основу для последующего содержательного анализа результатов, полученных диссертантом. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации автора в области биохимии и биотехнологии.

На основании проведенного анализа литературы автор делает обоснованный вывод о том, что люцифераза светляков по своим физико-химическим свойствам имеет большой потенциал для применения в биоаналитических системах, который к настоящему времени недостаточно реализован. С учетом разработок предшественников убедительно формулируется цель исследования и перечень решаемых задач.

В разделе «Экспериментальная часть» представлены методы, реализованные в рамках проведенного исследования: выделение и очистка плазмидной ДНК, секвенирование ДНК, конструирование и получение плазмид, кодирующих трансформированные и гибридные белки, очистка наработанных белков, характеристика их каталитических свойств, термостабильности, четвертичной структуры, применение гибридных белков в иммуноферментном анализе для детекции клеток *Salmonella*, применение гибридного белка Luc-SA для детекции биотинилированной ДНК клеток *E. coli*, BRET-иммуноанализ и гетерогенный конкурентный иммуноанализ прогестерона с использованием люциферазы. Данный ряд методов соответствует поставленным в диссертационной работе задачам. отражает современный методический уровень молекулярно-биологических и биоаналитических исследований. Используемые методы описаны с высокой степенью подробности, что позволяет однозначно интерпретировать получаемые результаты. Не

вызывает сомнения приобретение Д.В. Смирновой при выполнении диссертационной работы хорошей квалификации в области биохимии и биотехнологии.

Глава «Результаты и обсуждение» убедительно демонстрирует **новизну исследования и полученных результатов**. Д.В. Смирновой получены гибридные белки - люцифераза *L. mingrelica* с биотинсвязывающим (*in vivo* биотинилируемым) доменом и стрептавидином. Биотинилированные гибридные белки для люцифераз светляков были описаны ранее, но для люциферазы *L. mingrelica* они получены впервые. При исследовании гибридного белка люцифераза-стрептавидин впервые показано, что структура плазмиды, кодирующей данный гибридный белок, влияет на его олигомерный состав, люциферазную активность и сродство к биотину. Проведено сравнение трех продуцентов гибридного белка люцифераза-стрептавидин и выбран наиболее активный продуцент.

Ряд представленных результатов непосредственно относятся к разработке и характеристике биоаналитических систем и подтверждают **значимость диссертационной работы для науки и производства**. С использованием наработанных гибридных белков реализованы гетерогенный ИФА клеток *Salmonella* и ДНК-анализ клеток *E.coli*. Особого внимания заслуживает разработка биоаналитической BRET-системы. В качестве донора энергии была использована люцифераза светляков, а в качестве акцептора – краситель Alexa Fluor610x. Для реализации переноса энергии в аналитических межмолекулярных комплексах Д.В. Смирнова разработала эффективные методы синтеза конъюгатов люциферазы с антигеном (прогестероном) и конъюгатов антител к прогестерону с красителем. Выбраны условия получения реагентов и проведения анализа, обеспечивающие достоверное детектирование прогестерона в концентрациях от 0,5 нг/мл. Отметим, что данные результаты являются первым примером успешного использования люциферазы светляков в гомогенном конкурентном иммуноанализе на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии.

Не вызывает сомнения **обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**. Результаты исследования логично и последовательно изложены. Результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Используемый при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность и высокую точность получаемых количественных характеристик тест-систем. Выводы и рекомендации, сформулированные на основании полученных результатов, обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Описываемые эффекты и закономерности подтверждены корректно спланированными контрольными экспериментами. В целом, работа представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком теоретическом и экспериментальном уровне.

Результаты работы представлены научному сообществу на девяти российских и международных конференциях; основные положения и выводы диссертации опубликованы в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. В виде публикаций и докладов представлены все основные результаты диссертации. Содержание диссертационной работы соответствует специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология). Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Конструирование экспрессионных векторов для получения люциферазы и ее гибридных белков со стрептавидином было основано на использовании достаточно хорошо изученной системы Студиера. Однако первичная структура про-стрептавидина содержит сигнальный пептид и к настоящему времени в литературе есть множество данных о высокоэффективной транслокации и созревании стрептавидина и гибридных белков на его основе в периплазматическом пространстве клеток *E. coli*. Преимущества такого подхода очевидны, если учесть, что в периплазматическая фракция этой бактерии существенно обеднена протеазами. Возможно, что этот подход во многом способствовал бы и отсутствию протеолиза (но не коэкспрессии) гибридного белка, приводящего к появлению свободной люциферазы в суммарной фракции гибридного белка.
2. Для оценки прикладного потенциала люциферазы в качестве метки в гетерогенных аналитических системах крайне важно иметь результаты сопоставления по пределу обнаружения и рабочему диапазону аналитических систем, реализованных с использованием одних и тех же специфических реагентов, но с разными маркерами – традиционным (например, пероксидаза из корней хрена) и предлагаемым в работе (люцифераза *L. mingrelica*). Наличие данных прямой или косвенной сравнительной оценки маркеров повысило бы аргументированность практических рекомендаций.
3. В реализованной Д.В. Смирновой системе гомогенного BRET-иммуноанализа соотношение интенсивностей свечения I_{630}/I_{550} , используемое при построении градуировочной кривой, варьирует от 0,25 до 0,18, т.е. присутствие конкурента в пробе снижает регистрируемую величину всего не более чем на 25% (см. рис. 14-16 автореферата). Такое сужение диапазона варьирования аналитического сигнала увеличивает вклад ошибок дозирования и измерения, тем самым снижая точность анализа. В этой связи полезно обсуждение того, может ли диапазон варьирования BRET-сигнала быть расширен при использовании конъюгатов другого состава, других пар люцифераза-акцептор.
4. Приведенные в диссертации данные о гомогенном BRET-иммуноанализе прогестерона (раздел 4.4.4 диссертации) ограничиваются изучением чистых растворов. Представляет интерес пригодность метода для работы с реальными биопробами, содержащими

прогестерон. Этот вопрос для BRET-иммуноанализа имеет важное значение, т.к. компоненты биопроб могут влиять на регистрируемые в анализе интенсивности свечения I_{630} и I_{550} . Возможно ли проведение анализа без пробоподготовки, а если нет – какой вариант пробоподготовки позволит сохранить экспрессность иммуноанализа с минимальными потерями в чувствительности?

Вышеизложенные соображения имеют частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают общую положительную оценку работы.

В диссертационной работе Д.В. Смирновой убедительно показан потенциал люциферазы *Luciola mingrelica* как маркера для биоаналитических систем. Представляется крайне перспективным дальнейшее развитие этих разработок. **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации** включают как расширение области применения предложенных подходов для детекции других практически востребованных объектов, так и более детальную характеристику эффективности предложенных методов для тестирования реальных биопроб, выбор и обоснование наиболее эффективных протоколов получения реагентов, комплектаций тест-систем и методик проведения анализа.

С полученными в диссертационной работе результатами целесообразно ознакомить следующие организации: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Биологический факультет), Сибирский федеральный университет (Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск), Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт биофизики СО РАН (Красноярск), Институт аналитического приборостроения РАН (Санкт-Петербург), НИИ физико-химической медицины ФМБА РФ, ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения».

Результаты исследований Д.В. Смирновой, выносимые на защиту, представлены соискателем в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН и обсуждены на межлабораторном семинаре с участием лабораторий иммунобиохимии, физической биохимии и молекулярной инженерии 14 мая 2015 г. (протокол № 5). На основании проведенного обсуждения диссертации подготовлен настоящий отзыв.

Диссертация Д.В. Смирновой «Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и их биоаналитическое применение», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология), является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа полностью

соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09 2013 г. № 842, редакция от 30.07 2014 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям. В соответствии с п. 9 вышеуказанного положения соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биохимии и биотехнологии: получены гибридные белки на основе люциферазы *Luciola mingrelica* и охарактеризовано их биоаналитическое применение. Таким образом, автор представленной диссертации, Смирнова Дарья Васильевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН),
доктор химических наук, профессор

18 мая 2015 г.

 Б.Б. Дзантиев





Почтовый адрес: ИНБИ РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия
Телефон: (495)954-31-42. Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе 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 и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Полное и сокращенное название ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, ИНБИ РАН
Почтовый адрес	ИНБИ РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	http://www.inbi.ras.ru/
Телефон	(495)954-52-83
Адрес электронной почты	inbi@inbi.ras.ru
Фамилия Имя Отчество, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации и лица, утвердившего отзыв ведущей организации	Попов Владимир Олегович; директор ИНБИ РАН, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН
Фамилия Имя Отчество лица, составившего отзыв ведущей организации, ученая степень, отрасль науки, научные специальности, по которым им защищена диссертация, ученое звание, должность и полное наименование организации, являющейся основным местом его работы	Дзантиев Борис Борисович, Доктор химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия», профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией иммунобиохимии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Dzantiev B.B. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i>, 2013, v. 405, N 14, p. 4997-5000.</p> <p>Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. <i>TRAC-Trends in Analytical Chemistry</i>, 2014, v. 55, p. 81-93.</p> <p>Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C 60 and development of a fullerene enzyme immunoassay. <i>Analyst.</i>, 2012, v. 137, N 1, p. 98-105.</p> <p>Loginov D.S., Vavilova E.A., Savinova O.S., Abyanova A.R., Chulkin, A.M., Vasina, D.V., Zherdev A.V., Koroleva, O.V. Immunoassays of fungal laccases for screening of natural enzymes and control of recombinant enzyme production. <i>Biotechnol Appl Biochem.</i> 2014, v. 61, N 2, p. 230-236.</p>

Safenkova I, Zherdev A, Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2012, v. 403, N 6, p. 1595-1605.

Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of atomic force microscopy for characteristics of single intermolecular interactions. *Biochemistry (Moscow)*, 2012, v. 77, N 13, p. 1536-1552.

Safonova T.N., Mikhailov S.N., Veiko V.P., Mordkovich N.N., Manuvera V.A., Alekseev C.S., Kovalchuk M.V., Popov V.O. and Polyakov K.M. High-syn conformation of uridine and asymmetry of the hexameric molecule revealed in the high-resolution structures of *Shewanella oneidensis*MR-1 uridine phosphorylase in the free form and in complex with uridine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2014, v. 70, N 12, p. 3310-3319.

Syrkina MS, Shirokov DA, Rubtsov MA, Kadyrova EL, Veiko VP, Manuvera VA. Preparation and functional evaluation of RGD-modified streptavidin targeting to integrin-expressing melanoma cells. *Protein Engineering Design & Selection* 2013, v. 26, N 2, p. 143-150.

Taranova N.A., Byzova N.A., Zaiko V.V., Starovoitova T.A., Vengerov Yu.Yu., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs. *Microchimica Acta*. 2013, v. 180, N 11-12, p. 1165-1172.

Urusov A.E., Kostenko S.N., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ochratoxin A immunoassay with surface plasmon resonance registration: Lowering limit of detection by the use of colloidal gold immunoconjugates. *Sensors and Actuators. B: Chemical*. 2011, v. 156, N 1, p. 343-349.

Ученый секретарь ИНБИ РАН,
канд. биол. наук

А.Ф. Орловский



Орловский А.Ф.

ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией

22 мая 2015 г.