

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Смирновой Дарьи Васильевны «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, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

В настоящее время одним из наиболее актуальных направлений исследований по созданию биолюминесцентных аналитических систем является разработка генно-инженерных конструкций на основе люциферазы светляков. Диссертационная работа Д.В.Смирновой отражает результаты экспериментальных исследований по получению гибридных (биотин- и стрептавидин-люциферазных) белков, исследование их биохимических и каталитических свойств, и применению полученных препаратов в биолюминесцентном анализе клеток *Salmonella* и фрагментов ДНК клеток *E.coli*. Биотехнологическая часть работы заключалась в разработке новой биолюминесцентной аналитической системы, основанной на резонансном переносе энергии (BRET) в конъюгатах мутантных форм термостабильной люциферазы с антигеном и конъюгатов красителя Alexa Fluor с антителами. В этом же направлении может рассматриваться разработка BRET - метода гомогенного иммуноанализа прогестерона с применением конъюгатов люциферазы с прогестероном и конъюгатов антител к прогестерону с красителем. Поставленные задачи решались с применением современных молекулярно-генетических, биохимических, микробиологических и физико-химических методов.

К основным достижениям работы следует в первую очередь отнести получение новых плазмид, кодирующих гибридные белки – люцифераза - биотин-связывающий домен и люцифераза-стрептавидин – с использованием гена термостабильной люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Установлено, что гибридный белок His₆-SA-Luc, обладает высокой люциферазной активностью в тетрамерной форме. Разработаны технологии получения высокоактивных и стабильных конъюгатов люциферазы с прогестероном и антител к прогестерону с красителем FI-Ab. Как перспективное направление следует отметить эксперименты по получению термостабильных мутантов люциферазы светляков и их использование в биолюминесцентном резонансном (BRET) переносе энергии. Показанная автором эффективность применения гибридных белков в биоспецифичном иммуноанализе клеток *Salmonella* и специфических фрагментов ДНК клеток *E.coli*, перспективна для научных генно-инженерных исследований, и практических задач детекции микроорганизмов. Фактически с использованием гибридных белков получен новый класс высокочувствительных биолюминесцентных аналитических систем, основанных на биотин-стрептавидиновых взаимодействиях. Автором работы, на примере клеток *Salmonella*, предложена схема двухстадийного сэндвич анализа микроорганизмов. Пороговая чувствительность (10^4 - 10^5 КОЭ/мл.), экономичность и быстрое действие аналитической процедуры, свидетельствуют о перспективности использования полученных гибридных (luc-beep, luc-SA) белков в качестве аналитических датчиков в системах иммунного и гибридного анализа клеток и сегментов ДНК. Совокупность полученных результатов обоснованно свидетельствует о высоком теоретическом и экспериментальном уровне работы. Новизна и научно-практическая значимость представленных данных, прежде всего, определяются перспективностью применения метода в количественном анализе патогенной микрофлоры.

Необходимо отметить, что молекулярно-генетические эксперименты по получению плазмид, кодирующих гибридные белки люциферазы светляков, также как биохимические и кинетические исследования полученных белков, несмотря на их трудоемкость, проведены скрупулезно и корректно. Принципиальных замечаний по постановке экспериментов и их интерпретации нет. Приведенный в автореферате перечень статей, тезисов, также как участие в отечественных и зарубежных конференциях, свидетельствуют о высоком уровне научной работы диссертанта.

Автореферат Д.В.Смирновой свидетельствует, что данная работа выполнена на высоком научном и экспериментальном уровне, написана хорошим языком, аккуратно оформлена. Представленные в автореферате исследования достоверны, выводы и рекомендации научно обоснованы.

Таким образом, диссертационная работа Смирновой Дарьи Васильевны является законченным, высококвалифицированным научным трудом, и удовлетворяет требованиям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальностям: 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Главный научный сотрудник
кафедры микробиологии биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
доктор биологических наук, профессор
Тел. (495) 939 3033, e-mail: mguru@mail.ru.
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет
МГУ



Р.Н.Ивановский

Подпись главного научного сотрудника, доктора биологических наук, профессора
Ивановского Руслана Николаевича заверяю.

Ученый секретарь Биологического факультета МГУ



Е.В.Петрова

ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ



Ивановского Р.Н.
Петровой Е.В.