

## 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).

Диссертация Смирновой Д. В. посвящена крайне интересной и актуальной теме – получению и исследованию свойств гибридных белков на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Биоаналитические подходы с использованием этого фермента в настоящее время применяются очень широко благодаря его уникальным свойствам – высокой чувствительности и специфичности сигнала, а также простоте получения рекомбинантного белка в бактериальной системе экспрессии. Расширение областей применения биоаналитических реагентов на основе люциферазы может быть обеспечено путем конструирования различных бифункциональных молекул, сочетающих в себе свойства фермента и способность селективно связывать целевой лиганд. В данной работе была поставлена задача получения таких реагентов, включая биотинилированную люциферазу и стрептавидин-люциферазу, с помощью методов генной инженерии, и характеристики возможностей их биоаналитического применения.

Первая часть диссертационной работы включает результаты экспериментов по оптимизации экспрессионных конструкций и выделению рекомбинантных гибридных белков. Смирновой Д. В. впервые получены гибридные белки на основе люциферазы светляков *L. mingrelica*, содержащие биотин-связывающий домен и стрептавидин. Значительный интерес представляет характеристика различных форм гибридного белка люцифераза-стрептавидин. Результаты проведенных исследований доказывают наличие существенных отличий биологической активности у димеров, тетрамеров и высокомолекулярных агрегатов, а также различное содержание этих форм в составе полученных препаратов. Автор не вполне корректно делает вывод о том, что «структура плазмиды существенно влияет на соотношение олигомерных форм», скорее следует говорить о структуре кодирующей последовательности гибридного белка, и прежде всего о порядке расположения доменов, т.к. векторная часть плазмиды одинакова во всех использованных конструкциях. Во второй части работы гибридный белок люцифераза-стрептавидин (Luc-SA) был использован для специфической детекции клеток *Salmonella* методом двухстадийного сэндвич-анализа, а также клеток *E. coli* методом ПЦР. Оба метода продемонстрировали высокую чувствительность, что доказывает перспективность применения гибрида Luc-SA в качестве основы для различных биоаналитических применений. Необходимо отметить важность проделанной автором работы по оптимизации условий ПЦР с целью снижения неспецифической сорбции белка, которая нередко представляет собой серьезную проблему в подобных анализах.

Чрезвычайный интерес представляет часть работы, посвященная разработке метода иммуноанализа прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы светляков. С этой целью Смирновой Д. В. была впервые получена новая мутантная форма люциферазы *L. mingrelica* (GLuc), обладающая максимумом биолюминесценции в зеленой области, а также ее конъюгаты с прогестероном. Проведена тщательная оптимизация всех этапов иммуноанализа, что позволило добиться более высокой



скорости и простоты метода по сравнению с гетерогенным иммуноанализом прогестерона с биoluminesцентной детекцией при сопоставимой чувствительности.

В процессе работы Смирнова Д. В. успешно использовала широкий арсенал традиционных биохимических и новейших молекулярно-биологических и биофизических методов. Необходимо отметить тщательность в планировании и постановке экспериментов, а также аккуратность обработки данных и описания результатов. В ряде рисунков отсутствуют планки погрешностей, однако этот недостаток не умаляет значимости работы, которая безусловно проведена на высоком теоретическом и методическом уровне.

Полученные Смирновой Д. В. результаты являются перспективной основой для разработки новых высокочувствительных систем скрининга и имеют большое значение для развития биоаналитического направления в биотехнологии. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК. Автореферат достаточно подробно отражает этапы проведенных исследований и содержит квалифицированное обсуждение полученных данных. В целом, работа отвечает всем требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, принятого ВАК при Минобрнауки РФ, а соискатель Смирнова Дарья Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Петровская Лада Евгеньевна  
Старший научный сотрудник Института  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
кандидат химических наук

18 мая 2015 г.

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
телефон 8(495)3306983  
E-mail [lpetr65@yahoo.com](mailto:lpetr65@yahoo.com)

личную подпись:

УДОСТОВЕРЯЮ



СПЕЦИАЛИСТ ОТДЕЛА  
КАДРОВ ИБХ РАН  
ПЕТРОВСКАЯ Е.Б.

5