

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации В.Г. Панфёрова на тему:  
«Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для  
создания экспрессных методов определения фитопатогенов»  
по специальности 03.01.04 Биохимия

Задача диссертационного исследования В.Г. Панфёрова состояла в развитии технологии иммунохроматографической детекции белков-антигенов, в частности для иммунодиагностики вирусных инфекций картофеля на молекулярном уровне.

Диагностика на молекулярном уровне ставит окончательный диагноз зараженности организмов тем или иным патогеном. В настоящее время развито несколько технологий молекулярной диагностики инфекций высших организмов. Специфика диагностики инфекций в сельском хозяйстве выделяет те технологии, которые применимы для определения как в посадочном материале, так и в поле широкого круга фитопатогенов, значительно различающихся по морфологии, структуре и физико-химическим свойствам. Поэтому одним из главных требований, предъявляемых ко всем современным способам внелабораторной иммунодиагностики в сельском хозяйстве, является полная готовность диагностического набора к массовому тестированию. Он должен включать все необходимые реагенты тест-системы. Для проведения анализа необходимо лишь добавить анализируемый растительный экстракт образца, что инициирует иммунохимические взаимодействия и формирование регистрируемого сигнала в контрольной и анализируемой пробах. Идеально в подобных тест-системах использование меток, позволяющих осуществлять обнаружение инфекции путем простого визуального считывания без применения каких-либо проявляющих компонентов. В целях дальнейшего повышения чувствительности технологии могут быть использованы как флуоресцентные маркеры, так и разные усилители регистрируемого сигнала.

Данным требованиям отвечает быстро развивающаяся современная аналитическая технология иммунохроматографического анализа широкого спектра биологически активных соединений различной природы на тест-полосках. В силу простоты и скорости анализа она постепенно вытесняет традиционные твердофазные методы ИФА. Быстрые и легкие в использовании аналитические иммунохроматографические тест-системы (ИХТС) позволяют проводить массовые высокочувствительные полуколичественные измерения без специальных навыков и оборудования в полевых условиях. Являясь эффективным средством диагностирования, подобные экспресс-тесты дают возможность в течение нескольких минут визуально определить и оценить содержание фитопатогенов.

Анализ образцов иммунохроматографией на тест-полосках проходит следующие стадии: создание ИХТС, подготовка образца к анализу, подбор условий анализа и обработка его результатов.

Главным компонентом ИХТС являются иммунокомпоненты. Диссертант использовал первичные моноклональные и поликлональные антитела. Вирусные



антигены поливалентны, поскольку основным антигеном вируса является белок оболочки вируса, многократно представленный в вирусном капсиде. Очевидно, что в силу сложности и разнообразия вирусных антигенов необходим структурный анализ иммунокомплексов «антиген-антитело» и подбор кинетических условий анализа. В.Г. Панфёров успешно использовал атомно-силовую микроскопию и капиллярный электрофорез для анализа структуры комплексов антитела – вирус X картофеля (ХВК) и определил кинетические и равновесные константы ассоциации и диссоциации этих антител с ХВК.

Введение хромогенной метки в антитело и получение стабильных конъюгатов первичных антител с меткой является исключительно важной частью ИХТС. Соискатель отдает предпочтение классической метке антител в иммуноанализе – наночастицам (20 нм) коллоидного золота, имеющих красный цвет. Известно, что чувствительность определения вирусов картофеля подобными антителами составляет 1-30 нг/мл.

Для повышения чувствительности анализа, его достоверности и сохранения его экспрессности В.Г. Панфёров использует биохимический и физико-химические способы. Использование в анализе наночастиц золота, связанных с щелочной фосфатазой, позволило увеличить чувствительность анализа более, чем на порядок за счет высокого числа оборотов фермента с хромогенным субстратом. Применение функциональных магнитных наночастиц, связанных с биотинилированными первичными антителами против ХВК и наночастиц золота, связанных со стрептавидином, позволило поднять чувствительность более, чем на порядок как за счет поливалентного связывания биотина со стрептавидином, так и за счет агрегации магнитных наночастиц с наночастицами золота. Более, чем на 2 порядка удалось поднять чувствительность детекции X вируса картофеля, что является несомненно большим достижением диссертанта, после проведения иммунохроматографии восстановлением солей золота и серебра на поверхности наночастиц коллоидного золота в тестовой зоне тест-полоски. Усиление сигнала объясняется увеличением окрашенных частиц в объеме более чем на 3 порядка.

Будущее в массовой практической молекулярной диагностике, по-видимому, принадлежит чипам низкой плотности, на которых можно провести одновременный высокочувствительный экспресс-анализ для определения наиболее экономически важных местных патогенов. Прототипами такого чипа являются 2 типа мультиплексных ИХТС, защищаемых диссертантом. В первом случае используются конъюгаты наночастицы золота, в которых наночастица связана сразу с несколькими антителами против различных патогенных вирусов и бактерий картофеля (мультиспецифичный конъюгат), а на мембрану в тестовую зону в виде точек наносятся специфические антитела к каждому вирусу картофеля. В процессе анализа мульти-специфичный конъюгат, специфически связавший вирусы картофеля, фиксируется через вирусную частицу со специфичными антителами в тестовой зоне, образуя окрашенную точку. Сложной в этом случае является оптимизация условий для получения оптимального мультиспецифичного конъюгата.

В другом, более мощном - используется смесь разных конъюгатов наночастиц и антител, в которой каждый конъюгат специфичен к одному вирусу. В этом варианте анализа соискателю удалось определить одновременно 4 вредных бактерии и 6 вирусов картофеля. Последующее усиление сигнала восстановлением ионов серебра на наночастицах золота привело к уровню чувствительности диагностики, сопоставимому с определением индивидуальных вирусов традиционным планшетным сэндвич-ИФА.

Обращаясь к критическим замечаниям к реферату, можно заметить, что в постановке диагноза необходима достоверная воспроизводимость результатов диагностики. К сожалению, в реферате не уделено должного внимания статистической обработке результатов. Не указано также происхождение используемых антител, непонятно что такое компоненты растительных матриц, не мешающих анализу? Если имеется ввиду внеклеточный матрикс, то здесь не менее важен эффект и клеточного содержимого. Непонятно также, почему на рис. 6а магнитная частица имеет вдвое меньший диаметр, чем на рис. 6б и 6в.

В целом В.Г. Панферовым выполнено важное экспериментальное исследование, достаточно полно опубликованное в научной печати. Разработанные в диссертации методы можно использовать для определения патогенов и вызываемых ими инфекций как в сельском хозяйстве на практике, так и в практической медицине, а Василий Геннадиевич Панфёров несомненно заслуживает присуждения ему степени кандидата химических наук.

Ю.Ф. Дрыгин  
Д.х.н., зав.лаб.  
Молекулярной биологии вирусов  
НИИ ФХБ им. Белозерского  
МГУ им. М.В. Ломоносова

Подпись Ю.Ф. Дрыгина ЗАВЕРЯЮ

29 мая 2019 г.

Зав.канцелярией  
НИИ ФХБ им. Белозерского

Н.Н. Сидорова

