

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»



д.б.н., профессор Шестопапов А. М.

30 октября 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – **Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»** – на диссертационную работу **Оскорбина Игоря Петровича «Клонирование и характеристика химерных ДНК-полимераз на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 и ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi*, ДНК-связывающего белка *Sulfolobus tokodaii*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Актуальность темы диссертационной работы

Амплификация нуклеиновых кислот широко применяется в фундаментальной науке и прикладных областях; в частности повсеместное распространение получила полимеразная цепная реакция. Спектр использования ПЦР чрезвычайно широк, начиная от полногеномной амплификации и заканчивая детекцией ДНК патогенов человека, сельскохозяйственных животных и растений. Тем не менее, ограничения

ПЦР, в частности, потребность в специальных приборах и сложность амплификации протяжённых фрагментов ДНК, обуславливают потребность в альтернативных ПЦР методах амплификации ДНК. В связи с этим был разработан ряд методов амплификации нуклеиновых кислот, собирательно называемых методами изотермической амплификации по причине проведения реакции при постоянной температуре.

Распространённым приёмом, позволяющим проводить амплификацию нуклеиновых кислот при постоянной температуре, является использование цепь-вытесняющей активности ДНК-полимераз. За счёт способности при синтезе ДНК вытеснять уже существующую цепь в 5'-3' направлении ДНК-полимеразы разделяют цепи ДНК без повышения температуры или применения специальных химических реагентов. Наиболее часто применяемая ДНК-полимераза с цепь-вытесняющей активностью – большой фрагмент ДНК-полимеразы I бактерии *Geobacillus stearothermophilus* или Bst-полимераза. Вместе с тем, процессивность и устойчивость к ингибиторам Bst-полимеразы ограничены, что определяет необходимость получения новых ферментов с улучшенными свойствами. Исходя из этого диссертационная работа И.П. Оскорбина, посвящённая получению ДНК-полимераз с улучшенными свойствами, представляется актуальной и своевременной.

Научная новизна работы и полученных результатов

В диссертационной работе И.П. Оскорбина решён ряд важных практических задач, в том числе показано, что ДНК-связывающие белки способны нивелировать ингибирующий эффект гепарина на ПЦР, подобран оптимальный интеркалирующий краситель для изотермической петлевой амплификации в реальном времени, создан химерный фермент на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 и белка Sto7d *Sulfolobustokodaii* с повышенной процессивностью. Впервые продемонстрирована повышенная устойчивость химерной ДНК-полимеразы к ингибиторам амплификации.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Отдельным разделом представлены три приложения, содержащие последовательности праймеров и гидролизуемых проб, структуры векторов для экспрессии, использованных в работе, и диаграммы эффективности полногеномной амплификации геномной ДНК человека в зависимости от GC-состава и длины ампликона.

Во введении автор описал затронутую проблему, обозначил её актуальность, конкретизировал цель и задачи работы, охарактеризовал её теоретическую и практическую значимость и привёл положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из 12 подразделов и посвящён описанию свойств и функций ДНК-полимераз, а также содержит сведения о методах изотермической амплификации и полногеномной амплификации. Всего обзор литературы содержит информацию из 188 источников, значительная часть из которых представлена работами последних нескольких лет, и в достаточной степени освещает суть поднятой проблемы и её актуальность.

В главе «Материалы и методы» приведены реагенты и методы, использованные в исследовании. Приведённое описание позволяет получить ясное представление об использованных в работе методах и не оставляет сомнений в их воспроизводимости.

Раздел «Результаты и обсуждение» составлен из девяти подразделов. Первые два подраздела посвящены исследованию свойств ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* и его влиянию на ПЦР в режиме реального времени. Показано, что добавление этого домена в реакционную смесь ПЦР повышает эффективность протяжённой ПЦР и ослабляет ингибирующий эффект гепарина. Подразделы 3 и 4 описывают клонирование и характеризацию биохимических свойств большого

фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 (Gss-полимеразы). Продемонстрированы схожесть биохимических свойств Gss- Bst- и Bsm-полимераз и пригодность Gss-полимеразы для практического применения. В подразделе 5 изложены результаты выбора оптимального красителя для проведения изотермической петлевой амплификации в реальном времени; красители SYTO-82 и SYTO-9 представлены как оказывающие минимальный ингибирующий эффект на амплификацию одновременно с наибольшим отношением сигнала к шуму. В подразделах с шестого по девятый представлена информация по клонированию, исследованию биохимических свойств и практическому применению химерных ДНК-полимераз на основе Gss-полимеразы и дополнительных ДНК-связывающих доменов. Показано, что присоединение на С-конец Gss-полимеразы ДНК-связывающего белка Sto7d увеличивает процессивность и устойчивость химерного фермента к ингибиторам амплификации.

Суммируя вышесказанное, диссертация, несмотря на ряд допущенных опечаток, написана лаконично и ясно; достоверность полученных результатов и сделанных из них выводов не вызывает сомнений.

Замечания

Диссертационная работа производит хорошее впечатление, однако не лишена недостатков, в частности:

1. Остаётся неясным механизм повышения эффективности протяжённой ПЦР с помощью ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi*. Прояснение природы этого эффекта имеет самостоятельное фундаментальное значение и облегчило бы оптимизацию методик, используемых для протяжённой амплификации.
2. Представляется разумным проверить показавший наибольшую устойчивость к ингибиторам химерный фермент Gss-Sto в тест-системе для диагностики у постели больного на реальных клинических образцах. Подобная проверка позволила бы подчеркнуть преимущества химерного фермента по сравнению с Gss- и Bst-полимеразами.

Приведённые замечания не снижают научную и практическую ценность работы и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Научная и практическая значимость результатов работы

Описанный в диссертационной работе подход по улучшению свойств ДНК-полимераз и полученный с его помощью химерный фермент вносят значимый вклад в развитие методов изотермической амплификации. Созданные химерные ферменты могут быть применены для создания устойчивых к ингибиторам тест-систем для выявления патогенов человека и сельскохозяйственных животных и растений, а также использованы для полногеномной амплификации, в том числе в рамках подготовки проб для массового параллельного секвенирования. Отдельную ценность представляет собой характеристика набора флуоресцентных красителей в контексте проведения изотермической петлевой амплификации, что позволит облегчить подбор оптимальных условий для основанных на этой методике тест-систем. Результаты работы могут представлять интерес для организаций, занимающихся исследованиями в смежных областях, в частности Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирского государственного университета, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Института белка РАН.

Заключение

Диссертационная работа И.П. Оскорбина посвящена созданию и характеристике свойств химерных ДНК-полимераз на основе Gss-полимеразы и ДНК-связывающих белков. Диссертация является законченным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно и на высоком уровне. Полученные в работе результаты, а также сделанные на их основе выводы, оригинальны и согласуются с поставленными целью и задачами. Основные результаты работы опубликованы в виде 4 статей в реферируемых научных изданиях и представлены в виде доклада на научной конференции. Автореферат полностью соответствует основным положениям диссертационной работы.

Представленная диссертационная работа отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, так как в ней решена научная задача, имеющая важное значение для разработки и использования методов изотермической амплификации, а её автор, Оскорбин Игорь Петрович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертация, автореферат диссертации и настоящий отзыв заслушаны и обсуждены на семинаре Лаборатории молекулярной генетики Федерального Исследовательского центра Фундаментальной и трансляционной медицины (г.Новосибирск), протокол № 8 от 26 октября 2018 г.

Отзыв подготовил
руководитель Лаборатории молекулярной генетики
Федерального Исследовательского Центра
Фундаментальной и Трансляционной медицины,
доктор биологических наук

Коваленко Сергей Петрович

