

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Аmplификация нуклеиновых кислот повсеместно используется в современной фундаментальной науке и молекулярной диагностике. За прошедшие с момента разработки ПЦР несколько десятилетий в этой области был достигнут значительный прогресс, однако по-прежнему сохраняется потребность в простых и надёжных методах умножения количества ДНК. Особую значимость эта задача приобретает в связи с развитием диагностических методов, предполагающих проведение процедур анализа вне оборудованных лабораторий.

Для преодоления ограничений ПЦР был разработан ряд способов амплификации при постоянной температуре (изотермической амплификации) ДНК. Многие методы изотермической амплификации (LAMP, MDA, SDA) основаны на использовании цепь-вытесняющей активности некоторых ДНК-полимераз. Вместе с тем, устойчивость к ингибиторам и некоторые другие биохимические свойства, в том числе процессивность, природных ДНК-полимераз могут требовать повышения для более эффективного использования ДНК-полимераз. Таким образом, затронутая в диссертационной работе проблема получения ферментов с улучшенными свойствами продолжает оставаться **актуальной и своевременной**.

**Научная новизна** работы Игоря Петровича не вызывает сомнений. Так, впервые было показано, ДНК-связывающие белки способны нивелировать ингибирование ПЦР гепарином, оценена пригодность интеркалирующих красителей для проведения изотермической петлевой амплификации, создан химерный фермент на основе аналога *Bst*-полимеразы и ДНК-связывающего белка *Sto7d*. Эти результаты позволят значительно облегчить использование и оптимизацию методов изотермической амплификации.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка процитированной литературы и трёх приложений. Работа изложена на 124 страницах, содержит 35 рисунков и 13 таблиц. Во введении автор обосновал актуальность поднятой проблемы, наметил пути её решения, привёл цель и задачи работы и привёл положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы сосредоточен на описании свойств и функций ДНК-полимераз, методов их улучшения. Кроме того, в нём приведены сведения о методах изотермической амплификации и полногеномной амплификации. Всего обзор литературы содержит информацию из 188 источников и даёт возможность получить достаточное представление о затронутом предмете.

Глава «Материалы и методы» содержит описание реагентов и методов, использованных в работе, и позволяет полностью воспроизвести все проведённые в работе эксперименты.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на несколько частей, каждая из которых посвящена отдельному этапу работы. Автором описано клонирование и исследование биохимических свойств ДНК-связывающего белка ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi*, большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp 777 (Gss-полимеразы), набора химерных ферментов на основе Gss-полимеразы и ДНК-связывающих белков. Кроме того, проведено сравнение эффективности интеркалирующих флуоресцентных красителей в изотермической петлевой амплификации. Автором показано, что присоединение дополнительного ДНК-связывающего домена к Gss-полимеразе увеличивает процессивность и устойчивость к ингибиторам химерного фермента. Таким образом, сконструирована химерная ДНК-полимераза, позволяющая облегчить создание тест-систем на основе изотермической амплификации для диагностики у постели больного. В целом, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, сделанные на основе результатов выводы обоснованы и корректны.

К работе имеется ряд вопросов:

1. Наличие неточностей и опечаток, затрудняющих восприятие текста диссертации и автореферата.
2. Для созданных ферментов остался неисследованным важный параметр ДНК-полимераз: точность синтеза.
3. Работу усилило бы создание тест-системы с использованием показавшей наибольшую устойчивость к ингибиторам химерной ДНК-полимеразы Gss-Sto7d.

Имеющиеся замечания ценность работы не снижают и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Сделанные в работе выводы и выносимые на защиту положения правомерны и полностью подтверждаются результатами проведённых экспериментов. Диссертационная работа И.П. Оскорбина представляет собой законченное исследование, в котором описано

решение важной задачи молекулярной диагностики – конструирование ДНК-полимераз с повышенной устойчивостью к ингибиторам. Таким образом, представленная работа по объему, новизне, актуальности, достоверности данных, обоснованности выводов и уровню публикаций полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор, Оскорбин Игорь Петрович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент,  
к.б.н., с.н.с. лаборатории иммуногенетики  
ИМКБ СО РАН  
31.10.2018

 Горчаков А.А.

Горчаков Андрей Александрович, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии,  
СО РАН.

г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева 8/2.

тел (383)363-90-72, e-mail: [gorchakov@mcb.nsc.ru](mailto:gorchakov@mcb.nsc.ru)

Подпись с.н.с. лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН Горчакова Андрея Александровича удостоверяю:

Ученый секретарь ИМКБ СО РАН





Ахмерова Л.Г.