

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 ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 – «Молекулярная биология»

Альтернативный подход к амплификации специфического образца ДНК, не требующий изменения температуры реакционной смеси, часто называют изотермической амплификацией. Протоколы её проведения варьируются, каждый из них имеет свои преимущества. В целом, проведение изотермической амплификации требует намного меньше времени и не требует амплификатора, что делает методику особенно удобной для применения в поле, и во время приема пациента. Преимуществами данной методики являются: быстрый протокол, минимальное количество требуемого оборудования, надежное проведение реакции в присутствии ингибиторов полимеризации, простая оптическая детекция прохождения реакции.

Отсутствие циклических изменений температуры требует для протокола новых термостабильных ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Среди наиболее используемых ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью относится большой фрагмент (БФ) ДНК-полимеразы I, выделенной из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* - БФ *Bst*-полимеразы. Основным свойством такой полимеразы является способность синтезировать новую цепь ДНК, вытесняя при этом уже существующую в 5'-3' направлении, в связи с чем исчезает необходимость в дополнительном этапе термической денатурации двуцепочечной молекулы ДНК. Однако для проведения изотермической амплификации (в особенности для диагностических целей) сохраняется потребность в более устойчивых ингибиторам и процессивных ДНК-полимеразах.

Ранее было показано, что химерные ферменты, состоящие из ДНК-полимеразного и ДНК-связывающего модулей, обладают повышенной процессивностью и устойчивостью к высоким концентрациям солей. Таким образом, присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов к БФ *Bst*-полимеразы или аналогичным белкам представляется перспективным с точки зрения получения ферментов с улучшенными свойствами. Созданию нового поколения полимераз для изотермической амплификации и посвящена работа диссертанта. Таким образом, задача, поставленная Оскорбиным И.П., необычайно актуальна.

Цель диссертационной работы Игоря Петровича заключалась в получении набора химерных ферментов на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 и ДНК-связывающих белков (ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d *Sulfolobus tokodaii*), характеристика их биохимических свойств и использование в практических приложениях: изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Для достижения поставленной цели диссертант обозначил **4 задачи**, в которые

входило:

клонирование и характеристика биохимических свойств большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777*, его сравнение с коммерческими ферментами в изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации;

определение оптимального флуоресцентного красителя для детекции результатов изотермической петлевой амплификации в реальном времени;

клонирование и характеристика биохимических свойств ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi*;

клонирование и характеристика биохимических свойств химерных ферментов на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и ДНК-связывающих белков (ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d *Sulfolobus tokodaii*), их использование в изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Научная новизна. Впервые показано, что добавление ДНК-связывающих белков может нивелировать ингибирующий эффект гепарина на ПЦР. Создан химерный фермент на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и белка Sto7d *Sulfolobus tokodaii* с повышенной процессивностью. Впервые показана повышенная устойчивость химерной ДНК-полимеразы к ингибиторам амплификации.

Подобран оптимальный флуоресцентный краситель для изотермической петлевой амплификации в реальном времени.

Практическая значимость. Созданный химерный фермент на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и белка Sto7d *Sulfolobus tokodaii* позволит повысить устойчивость изотермической петлевой амплификации к ингибиторам и эффективность полногеномной амплификации. Подобраный оптимальный флуоресцентный краситель для изотермической петлевой амплификации позволит повысить эффективность детекции результатов амплификации за счёт меньшего ингибирования реакции красителем. Выполненные научные исследования и полученные результаты в настоящей работе могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий и протоколов изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Текст изложен на 123 страницах, сопровождается 35 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 209 публикаций. Работа написана по традиционному плану, изложение достаточно четкое и последовательное.

Обзор литературы, изложенный на 28 страницах, включает анализ отечественных и иностранных источников. В обзоре изложены как фундаментальные сведения, так и проблемы практического применения, это делает его интересным и насыщенным. Обзор литературы состоит из двенадцати разделов. В первых разделах диссертант подробно описал историю открытия, структуру и классификацию ДНК-полимераз, в последующих подробно рассказал об использовании и улучшении свойств ДНК-полимераз для прикладных работ. Далее соискатель описал современные тенденции в разработке технологий изотермической и полногеномной амплификации. В целом литературный обзор охватывает необходимый и достаточный для понимания проблемы круг вопросов.

Перехожу к характеристике собственно результатов соискателя. Их изложение начинается с описания **материалов и методов**, использованных в работе. Этот раздел

дает представление о высоком современном методическом уровне работы. Автор успешно сочетает разнообразные молекулярно-биологические, химические, биохимические, и биотехнологические подходы по созданию новых ферментов для решения поставленных задач. Следует подчеркнуть, что введение каждого нового метода в работу не было излишеством и не представляло собой погоню за распространением арсенала современных методов, а явилось неизбежным логическим следствием решения конкретных научных задач.

Результаты и обсуждение. Данная работа посвящена получению набора химерных ферментов на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp.* 777 и ДНК-связывающих белков, характеристики их биохимических свойств и использованию в практических приложениях: изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Для решения поставленных задач соискателем был клонирован и охарактеризован оригинальный ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы термофильной археи *Pyrococcus abyssi* (именуемый в дальнейшем DBD). Даже в автономном состоянии ДНК-связывающий домен был способен повышать эффективность протяженной ПЦР, в результате чего возрастало количество продукта реакции. Неожиданным побочным эффектом добавления DBD в реакционную смесь ПЦР являлась его способность нивелировать ингибирующий эффект гепарина.

Далее диссертантом была секвенирована и проклонирована БФ Bst-полимеразы из *Geobacillus sp.* 777. Штамм-изолят мезофильных бактерий 777 был ранее получен в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» весьма оригинальным способом путем высевания на агаризованную среду смывов с осадка портвейна и культивации при 60°C. Рекомбинантный БФ Gss-полимеразы был наработан в клетках *E. coli* штамма XL10-Gold и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии. После очистки биохимические характеристики БФ Gss-полимеразы были сопоставлены с доступными коммерческими аналогами – большими фрагментами Bst-полимеразы (New England Biolabs, США) и Bsm-полимеразы (Lucigen, США). В частности, БФ Gss полимеразы использовали для проведения LAMP в режиме реального времени (quantitative LAMP, qLAMP) и полногеномной амплификации (ПГА) в сравнении с коммерческими ферментами.

Чувствительность LAMP с разными ферментами была определена путём титрования матрицы (ДНК фага лямбды) в реакции LAMP. БФ Bst- и Gss-полимераз продемонстрировали сходную способность детектировать присутствие матрицы, в то время как БФ Bsm-полимеразы менее эффективно катализировал LAMP в присутствии матрицы в количестве менее 10^3 копий на реакцию. Дополнительно была оценена устойчивость ДНК-полимераз к действию ингибиторов LAMP: SYBR Green I, гепарину, этанолу, плазме крови человека, цельной крови человека, мочевины, NaCl и ЭДТА. БФ Bst- и Gss полимераз сохраняли активность в присутствии 4 мкМ SYBR Green I, в то время как БФ Bsm-полимеразы терял активность. БФ Gss полимеразы показал наибольшую устойчивость к действию гепарина, этанола, мочевины и плазме крови человека; БФ Bsm-полимеразы был наиболее восприимчив к ним. К действию цельной крови все ферменты продемонстрировали одинаковую устойчивость.

Кроме LAMP, БФ Gss-полимеразы вместе с коммерческими аналогами были использованы для проведения ПГА геномной ДНК человека. БФ Gss-полимеразы показал наибольшую степень амплификации по четырём локусам, БФ Bst- и Bsm полимераз для

двух локусов, БФ Gss- и Bst-полимераз для одного локуса. Таким образом, было установлено, что термостабильность, оптимальные концентрации ионов и pH БФ Gss-полимеразы не отличаются от таковых для БФ Bst-полимеразы; БФ Gss-полимеразы пригоден для проведения полногеномной амплификации. Вместе с тем, БФ Gss-полимеразы показал более высокую устойчивость к ингибиторам амплификации (гепарину, этанолу, мочеvine и плазме крови человека).

С целью повышения эффективности процесса изотермической амплификации был осуществлён выбор оптимального красителя для проведения изотермической петлевой амплификации в реальном времени. При изучении эффективности ДНК-полимераз в LAMP выяснилось, что интеркалирующий краситель SYBR Green I мало подходит для LAMP в силу малого разгорания и сильного ингибирования реакции. Поэтому диссертантом было проведено сравнение различных интеркалирующих красителей. Были изучены интеркалирующие красители, ранее уже применявшиеся для проведения LAMP в реальном времени: SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82. Для оценки эффективности красителей в qLAMP были использованы три модельные системы: фаг лямбда, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), *E. coli*. В результате многочисленных экспериментов диссертантом было установлено, что из шести красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen) оптимальными для проведения qLAMP являются SYTO-9 и SYTO-82.

На следующем этапе работ было проведено клонирование и очистка химерных ДНК-полимераз на основе БФ Gss-полимеразы. Из ранее проведённых исследований было известно, что присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов или белков может увеличивать у ДНК-полимераз процессивность и устойчивость к высоким концентрациям солей. Однако подобные химерные ферменты не были описаны для БФ Bst полимеразы и его аналогов. Оскорбиным И.П. был клонирован и охарактеризован набор химерных ДНК-полимераз на основе БФ Gss полимеразы и белка Sto7d, аналога Sso7d из *S. tokodaii*, ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi*. Клонированные ферменты были наработаны в *E. coli* и очищены с помощью аффинной и ионообменной хроматографий.

После очистки были изучены биохимические свойства химерных ДНК-полимераз. Диссертантом было показано, что введение дополнительных ДНК-связывающих доменов усиливает способность фермента связываться с ДНК в растворах с высокими концентрациями солей. Таким образом, присоединение Sto7d позволило достоверно повысить аффинность химерных ферментов к ДНК. Далее Оскорбиным И.П. было показано, что присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов в три раза повысило наблюдаемую процессивность химерных ферментов. Все химерные ферменты сохранили способность вытеснять цепь. По результатам анализа биохимических свойств химерных ДНК-полимераз можно сделать вывод, что наличие дополнительных доменов не влияет на термостабильность, способность вытеснять цепь ДНК и селективность ферментов.

На заключительном этапе работы была отработана технология полногеномной амплификации с помощью ферментов с улучшенными свойствами. Полногеномная амплификация в формате процедуры с множественным вытеснением цепи является одним из основных применений Bst-подобных ДНК-полимераз. Проведённые работы продемонстрировали, что химерные ферменты с дополнительными ДНК-связывающими

доменами превзошли исходную ДНК-полимеразу по количеству продукта, сгенерированного в ПГА. Наибольшее количество продукта для 16 локусов из 20 было получено для Gss-Sto с Sto7d на С-конце.

Таким образом, Игорю Петровичу удалось удачно преодолеть «Долину смерти», ожидающую каждую научную разработку, провести трудоемкие исследования и сделать целый набор качественных биотехнологических продуктов. Это нечасто случается в нашей научной действительности.

Эту диссертацию я бы хотел рекомендовать как учебное пособие по тяжёлому научному и биотехнологическому труду, сочетающему хорошо продуманный эксперимент с глубоким анализом полученных результатов. Высокая технологичность созданных продуктов и протоколов изотермической амплификации нуклеиновых кислот основан не на волшебном слове, а на глубоких фундаментальных знаниях и хорошем техническом исполнении. Выполненные научные исследования и полученные результаты в настоящей работе, несомненно, должны быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки реальных диагностических протоколов.

Работа написана грамотным русским языком, материал изложен просто и доступно. Несмотря на хорошее впечатление о работе, имеются некоторые замечания. В работе слабо проведено обсуждение результатов, при определении процессивности химерных ферментов отсутствовала ловушка. Также работу усилило бы расширение панели ингибиторов LAMP, использовавшихся для оценки устойчивости химерных ферментов. Однако все это не снижает общего благоприятного впечатления от работы.

Отмеченные замечания не изменяют общей положительной оценки диссертации. В целом, экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы, весьма интересны. Решена научная задача, которая является заметным шагом вперед на пути к созданию высокочувствительных и специфичных протоколов изотермической амплификации нуклеиновых кислот и имеет практическое значение для медицинской и ветеринарной диагностики. Качество полученного материала и важность основных выводов заслуживает самой высокой оценки. Достоверность полученных результатов сомнений не вызывает.

Автореферат диссертации И. П. Оскорбина удовлетворяет требованиям ВАК России и в полной мере отражает ее наиболее существенные положения и выводы. Ключевые результаты работы И. П. Оскорбина адекватно отражены в опубликованных печатных работах. Апробация работы проведена на высоком уровне, результаты представлены на Российской симпозиуме «Белки и пептиды». Диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационное исследование И. П. Оскорбина «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*», выполнено на высоком уровне и полностью соответствует по актуальности, научной новизне, объёму и практической значимости полученных результатов требованиям, установленным пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней» (учреждённого Постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а его автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент

Лунин Владимир Глебович,
главный научный сотрудник
группы молекулярной диагностики
и генно-инженерных конструкций,
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации

ул. Тимирязевская 42, Москва, Россия, 127550
lunin1955@gmail.com +7 (916) 144-2264, +7 (499) 976-6544

Подпись В.Г.Лунина заверяю
Учёный секретарь ФГБНУ ВНИИСБ
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации



Е.И. Федина