

ОТЗЫВ

научного руководителя на диссертационную работу

Щур Вероники Владимировны «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, отрасль – химические науки

Синтетическая ДНК является основным инструментом для современной молекулярной биологии и биотехнологии. На сегодняшний день возможно создание двунитевой ДНК (днДНК) любой последовательности без непосредственного доступа к организму-источнику. Синтетические гены используются в разных областях от получения рекомбинантных белков и ферментов, ДНК-вакцин и генотерапевтических средств до синтеза искусственных геномов бактерий и хранения цифровых данных в виде ДНК.

Несмотря на существенный прогресс по-прежнему существует отставание между потребностями в искусственных генах и возможностями их быстрого и эффективного синтеза. Появление и совершенствование технологии синтеза днДНК вносит вклад и создает условия для развития в нашей стране биотехнологии и научных исследований.

Диссертационная работа В.В. Щур посвящена созданию потенциально автоматизируемой, экономичной и эффективной технологии получения произвольных последовательностей днДНК с использованием химико-ферментативного синтеза.

В работе соискателя впервые показано, что миниатюрная хроматографическая система, представляющая собой коммерческие наконечники для твердофазной экстракции с обращенно-фазовым сорбентом известной емкости, позволяет одновременно проводить дозирование и очистку смесей олигонуклеотидов разной длины. Применение такой системы в сочетании с разработанной методикой очистки позволяет сократить в 36 раз затраты времени на стадии подготовки олигонуклеотидов.

Найдено, что новый способ ферментативной сборки, основанный на комбинации двух способов дизайна олигонуклеотидов и специальной температурной программы, позволяет объединить олигонуклеотиды в обогащенные целевой последовательностью ДНК-синтоны с длиной, в 1,5 раза превышающей известный предел длины синтона, а достигаемая чистота достаточна для лигирования полученного продукта в плазмидный вектор, минуя стадию очистки.

Впервые описано применение методов светорассеяния для наблюдения за процессом объединения олигонуклеотидов в днДНК, что в перспективе

может позволить сочетать сборку синтона с визуализацией ее продуктов в ходе онлайн мониторинга и отказаться от более затратной по времени стадии агарозного электрофореза.

Выявлено, что высокомолекулярные побочные продукты предложенной комбинированной сборки представляют собой регулярно повторяющиеся последовательности (конкатемеры), многократно увеличивающиеся в длине в результате конкатемерной цепной реакции. Источником таких побочных продуктов являются полупродукты ферментативного синтеза, образующиеся на начальной стадии сборки.

Впервые установлена стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции, а также возможность получения из модифицированных олигонуклеотидов днДНК. Определено влияние 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции лигирования тупых концов модифицированной днДНК, что позволило разработать селективный по отношению к укороченным побочным продуктам способ предотвращения их лигирования в плазмидный вектор.

Тема диссертационной работы соискателя соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190): п. 2 «Химический синтез и продукты»; п. 3 «Биологические системы и технологии» и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156): п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: системная и синтетическая биология».

Научные результаты, изложенные в диссертации В.В. Щур, опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных журналах, три из которых – в зарубежных изданиях, а также в 6 тезисах докладов на международных конференциях.

Искусственные гены, получаемые по разработанной лабораторной технологии, реализуются организациям Республики Беларусь. Также их использовали в заданиях государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» и государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия». Практическую значимость работы соискателя также подтверждают патент на изобретение «Способ получения смеси очищенных олигонуклеотидов для ферментативного синтеза двуцепочечной ДНК» ВУ 23440 от 30.06.2021 и два лабораторных технологических регламента на

изготовление синтетических олигонуклеотидов (№5/2019-ЛТР) и последовательностей ДНК (№6/2019-ЛТР).

Проекты, основанные на диссертационном исследовании, были удостоены призовых мест на двух конкурсах «100 идей для Беларуси» (2021 г.) и Республиканском конкурсе инновационных проектов (2021 г.). В 2021 году по результатам работы над диссертацией в ходе обучения в аспирантуре В.В. Щур была удостоена стипендии Президента Республики Беларусь аспирантам. В 2019 году соискателю и его соавторам была присуждена премия НАН Беларуси в области химических наук и наук о Земле за цикл работ о методах получения синтетических генов.

Учитывая все вышесказанное, считаю, что диссертация Щур Вероники Владимировны «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК» соответствует всем требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь для присвоения соискателю ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия за новые научно обоснованные результаты:

- способ получения пулов очищенных олигонуклеотидных блоков для ферментативного синтеза днДНК;

- метод программируемой ферментативной сборки днДНК, позволяющий получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 kb) ДНК-синтоны в одну стадию;

- применение методов светорассеяния для контроля процесса ферментативного синтеза днДНК из олигонуклеотидных блоков в режиме реального времени;

- механизм образования высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК-синтонов;

- установление влияния 5'-диметокситритильной защиты на активность ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, что позволило предложить способ селективного лигирования верных по длине синтонов в плазмидный вектор.

Научный руководитель,
Директор Института биоорганической
химии НАН Беларуси,
вед. науч. сотр. к.х.н., доцент



А.В. Янцевич

«23» ноября 2023 г.