

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор
учреждения образования
«Белорусский государственный
технологический университет»


А.А. Сакович
« 14 » 2024 г.

ОТЗЫВ

оппонирующей организации
учреждения образования «Белорусский государственный
технологический университет»
на диссертационную работу

Щур Вероники Владимировны

«Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Щур В.В. выполнена в лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси, является частью плановых НИР по государственным программам научных исследований, по отдельному проекту фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси, а также по гранту Президиума НАН для поддержки аспирантов и соответствует приоритетным направлениям научных исследований и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности Республики Беларусь. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Полный текст диссертации составляет 186 стр., в том числе 38 рисунков на 21 стр., 21 таблица на 9 стр. и 4 приложения на 13 стр. Список использованных источников включает в себя библиографический список из



179 наименований и список публикаций соискателя ученой степени (11 наименований).

Оценка диссертации по существу

Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки.

Диссертационная работа Щур В.В. посвящена разработке потенциально автоматизируемой, эффективной технологии получения произвольных последовательностей двунитевой ДНК с использованием химико-ферментативного синтеза. При проведении экспериментов, обсуждении и трактовке результатов в работе применяли методы и подходы современной органической и аналитической химии, а также молекулярной биологии.

Цель, задачи, объект и методы исследования диссертации Щур В.В., соответствуют специальности 02.00.10 – биоорганическая химия: п. 4. Высокомолекулярные соединения: природные и рекомбинантные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты, полисахариды и другие биополимеры. Выделение, синтез, модификация и структурно-функциональные исследования; п. 8. Создание высокоэффективных биотехнологических процессов; п. 9. Компьютерное моделирование структуры биологических молекул и их комплексов с лигандами раздела III Паспорта специальности, утвержденного Приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 8 января 2024 г. № 6, и отрасли «химические науки».

Автореферат полностью отражает содержание и выводы и соответствует основным положениям диссертации.

Научный вклад соискателя в решение научной задачи с оценкой его значимости.

Синтетическая биология – это научная область, которая объединяет принципы инженерии и биологии для модификации и создания новых биологических систем, полезных для медицины, промышленности, сельского хозяйства и других областей. Одним из ключевых инструментов синтетической биологии является химико-ферментативный *de novo* синтез ДНК. Это многостадийный процесс, для пяти из семи этапов которого в диссертационной работе были предложены новые способы реализации, позволяющие снизить расход времени и реагентов.

Научный вклад соискателя заключается в установлении возможности использования метода твердофазной экстракции на наконечниках, заполненных сорбентом известной емкости, для очистки смеси протяженных олигонуклеотидов непосредственно перед сборкой двунитевой ДНК; в разработке нового дизайна и способа объединения олигонуклеотидов в двунитевую ДНК, позволяющих увеличить предельную длину синтона в 1,5 раза и получить обогащенный целевой последовательностью продукт; в применении методов светорассеяния для наблюдения в режиме реального времени за процессом сборки двунитевой ДНК; в установлении конкатемерной природы и механизма формирования высокомолекулярных побочных продуктов ферментативного объединения олигонуклеотидов; в определении условий ПЦР, при которых сохраняется стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов, а также в демонстрации возможности сборки из них модифицированной по 5'-концам двунитевой ДНК, с которой не способна работать ДНК-лигаза Т4.

Конкретные научные результаты (с указанием их новизны и практической значимости), за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень.

Щур В.В. заслуживает присуждения степени кандидата химических наук за следующие научные результаты, имеющие практическую значимость и отличающиеся научной новизной.

1. Разработка способа одновременного дозирования и очистки пулов олигонуклеотидов для ферментативного объединения в двунитевую ДНК с использованием наконечников дозаторов для твердофазной экстракции с обращенно-фазовым сорбентом с диаметром пор 200 Å.

2. Разработка программируемой ферментативной сборки синтонов, основанной на комбинации двух способов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы, которая позволяет получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 kb) ДНК-синтоны в одну стадию.

3. Демонстрацию возможности использования светорассеяния для контроля ферментативного синтеза двунитевой ДНК из олигонуклеотидов в режиме реального времени.

4. Механизм образования высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК-синтонов, заключающийся в образовании

последовательности с идентичными фланкирующими участками в результате ошибочного отжига концевых олигонуклеотидов с последующей конкатемерной цепной реакцией.

5. Установление стабильности 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и влияния 5'-диметокситритильной защиты на активность лигазы T4 в реакции соединения тупых концов двунитевых ДНК, что позволило предложить способ селективного по отношению к укороченным побочным продуктам лигирования целевых генов в плазмидный вектор.

Замечания по диссертационной работе.

При анализе диссертации и автореферата не обнаружено существенных недочетов, которые бы ставили под вопрос достоверность научных выводов и положений. Однако имеется ряд замечаний и вопросов.

1. Определение зависимости эффективности очистки методом твердофазной экстракции от длины олигонуклеотидного блока для каждого из шести использованных сорбентов позволило бы выбрать оптимальную длину олигонуклеотидного блока для сборки синтона. По какой причине подобное систематическое исследование не было проведено?

2. На странице 9 автореферата указано, что метод твердофазной экстракции не позволяет полностью избавиться от примесей, но существенно улучшает чистоту конечного продукта. Какие примеси позволяет элиминировать данный метод?

3. На рисунке 4В автореферата представлено распределение молекул ТВС-синтона по массе и радиусу после амплификации. Для детектируемых молекул заметно две популяции молекул 1-10 нм и 10-100 нм. Какие именно продукты реакции соответствуют диапазону 10-100 нм?

4. В работе установлено, что присутствие тиольных соединений в буферном растворе для ПЦР повышает скорость детритилирования ДМТ-модифицированных олигонуклеотидов, что может снижать выход модифицированной двунитевой ДНК. Также в диссертации показано, что предпочтительно использовать ДНК-полимеразу Q5 для сборки синтонов. Буферный раствор этой полимеразы содержит β-меркаптоэтанол. Представляется ли автору целесообразной оптимизация состава буферного раствора для полимеразной цепной сборки?

5. Тимидин встречается только в ДНК. Поэтому согласно номенклатуре IUPAC индекс d перед его обозначением не ставится.

6. В тексте диссертационной работы имеются незначительные орфографические ошибки и неудачные выражения: п. 2.3.4 «Культивирование штаммов *E. coli*» и «.....поддержание вектора в штамме.....» (стр. 82); п. 2.3.7 «....зубочисткой дотрагивались до бактерий....» (стр. 84).

Приведенные замечания не снижают общего хорошего впечатления, а также научной и практической значимости диссертационной работы в целом.

Рекомендации по практическому применению результатов.

Практическая значимость созданной лабораторной технологии синтеза искусственных генов подтверждена наличием научно-технической документации (лабораторные технологические регламенты на изготовление синтетических олигонуклеотидов и последовательностей ДНК), патентом на изобретение и фактом реализации продукции в рамках хозяйственных договоров с организациями Республики Беларусь. Так в настоящий момент синтезирован 41 синтетический ген общей протяженностью 43 644 п.н. Синтетические гены в составе плазмидных конструкций применяются для выполнения заданий ГП и ГПНИ в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Анализ диссертационной работы позволяет заключить, что Щур В.В. выполнила большой объем работы, показав себя квалифицированным специалистом в области биоорганической химии, способным решать научные задачи. Достоверность представленных в диссертации результатов, обоснованность сформулированных выводов подтверждаются использованием в работе современных физико-химических методов анализа биополимеров.

По результатам, полученным при выполнении диссертационной работы, опубликованы 11 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, включенных в Перечень научных изданий, утвержденный ВАК Республики Беларусь, тезисы 6 докладов международных конференций, получен патент Республики Беларусь на изобретение.

Результаты диссертации вошли в цикл научных работ, отмеченных премией НАН Беларуси (2019 г.), а также были представлены на конкурсах «100 идей для Беларуси» (2021 г.), «Республиканский конкурс инновационных проектов» (2022 г.), где получили призовые места.

Учитывая вышесказанное, можно заключить, что квалификация Щур В.В. соответствует искомой ученой степени кандидата химических наук.

Заключение оппонировавшей организации.

Диссертация Щур В.В. по выбору направления исследования, актуальности решаемых проблем, научной новизне и практической значимости результатов соответствует требованиям пп. 19–26 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» и демонстрирует научную квалификацию автора.

Щур Вероника Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия за новые научно-обоснованные результаты, включающие:

- способ получения смесей очищенных протяженных олигонуклеотидов для ферментативного синтеза двунитевой ДНК, основанный на методе твердофазной экстракции с применением микрохроматографической системы известной емкости, что позволяет проводить одновременное дозирование и очистку олигонуклеотидов;

- способ объединения олигонуклеотидов в двунитевую ДНК на основе комбинации двух способов ПЦР-сборки синтона из олигонуклеотидных блоков, позволяющий получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 kb) синтоны в одну стадию;

- применение методов светорассеяния для наблюдения и контроля процесса сборки ДНК-синтона в режиме реального времени;

- определение природы и механизма образования конкатемерных высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК-синтонов;

- изучение стабильности 5'-диметокситритильных олигонуклеотидов и 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,

что в совокупности позволило создать потенциально автоматизируемую, эффективную лабораторную технологию химико-

ферментативного синтеза двунитевой ДНК произвольной последовательности и, в совокупности, вносит существенный вклад в биоорганическую химию нуклеиновых кислот и ферментов.

Устный доклад соискателя ученой степени кандидата химических наук Щур В.В., отзыв эксперта по диссертации заведующего кафедрой биотехнологии, кандидата химических наук, доцента Леонтьева В.Н. заслушаны и обсуждены на расширенном научном семинаре кафедры биотехнологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» (приказ ректора от 25.01.2024 г. № 50).

Присутствовали: 19 чел., в том числе д.н. – 1, к.н. – 13.

По диссертационной работе было задано 14 вопросов. Вопросы задавали: к.х.н. Леонтьев В.Н. – 1, к.х.н. Кузьменок Н.М. – 3, д.х.н. Безбородов В.С. – 2, к.б.н. Игнатовец О.С. – 5, к.б.н. Вакула С.И. – 3.

В голосовании приняли участие 14 человек.

Результаты голосования:

«ЗА» – 14, «ПРОТИВ» – нет, «ВОЗДЕРЖАЛИСЬ» – нет.

Председатель заседания,
доцент кафедры биотехнологии,
кандидат биологических наук, доцент



О.С. Игнатовец

Эксперт по диссертации, подготовивший отзыв,
заведующий кафедрой биотехнологии,
кандидат химических наук, доцент



В.Н. Леонтьев

Секретарь научного семинара,
доцент кафедры биотехнологии,
кандидат технических наук, доцент



Е.В. Феськова

