

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Щур Вероники Владимировны
«Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 00.02.10 – биорганическая химия

Разработка и внедрение геномных технологий – важнейшие условия развития современной биотехнологии, направленной на быстрое и эффективное получение новых видов продукции на основе синтезированных молекул ДНК. Разработка технологий получения искусственных генов важна для развития в нашей стране направления, связанного с применением генных технологий в фармакологии, лабораторной диагностике, микробиологии, сельском хозяйстве и др.

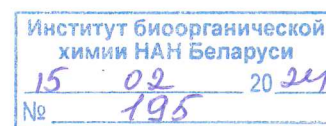
Диссертационная работа Щур Вероники Владимировны посвящена разработке эффективной технологии, которая позволяет получать произвольные последовательности ДНК с использованием химико-ферментативного синтеза.

Автором выполнен большой объем исследований по установлению оптимальных условий проведения различных стадий процесса получения плазмидного вектора, которые наряду с формированием дизайна включают разработку технологии подготовки олигонуклеотидов, синтеза из них ДНК с последующей амплификацией и клонированием продукта сборки в плазмидный вектор.

Цель диссертационной работы и задачи исследования сформулированы четко; полученные результаты, положения, выносимые на защиту, выводы раскрывают способы реализации цели – разработку лабораторной технологии химико-ферментативного *de novo* синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК, востребованных в биотехнологии и молекулярно-биологических исследованиях.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (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».

Новизна полученных автором научных результатов не вызывает сомнений. Она определяется:



– разработкой способа получения пулов очищенных олигонуклеотидов для ферментативного синтеза днДНК, который позволяет увеличить предельную длину синтона в 1,5 раза и получить обогащенный целевой последовательностью продукт;

– разработкой способа, позволяющего контролировать в режиме реального времени ферментативный процесс синтеза днДНК из олигонуклеотидов с использованием метода динамического светорассеяния;

– установлением конкатемерной природы высокомолекулярных побочных продуктов сборки днДНК из олигонуклеотидов и выявлением механизма их образования;

– обоснованием и разработкой способа селективного по отношению к укороченным побочным продуктам лигирования целевых генов в плазмидный вектор в реакции лигирования тупых концов двунитевой ДНК.

Заслуживает внимания высокий методический уровень исследований, выполненных автором (*твердофазный фосфорамидитный синтез, твердофазная экстракция, ВЭЖХ, электрофорез, ПЦР, клонирование, трансформация, выделение плазмидной ДНК, рестрикционный анализ, агарозный электрофорез, масс-спектрометрия, секвенирование по Сэнгеру, методы динамического и статического светорассеяния*), который предполагает хорошее владение современными методами исследования, навыки работы на дорогостоящем оборудовании и, – не могу не отметить как плюс, – наличие данного оборудования в институте создает условия для подготовки высокопрофессиональных кадров высокой квалификации.

Полагаю, что диссертационная работа Щур Вероники Владимировны «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК» по целям, задачам, полученным результатам, их научной новизне и практической значимости соответствует всем требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь для присвоения соискателю ученой степени кандидата химических наук по специальности 00.02.10 – биоорганическая химия.

Заведующий отделом доклинического
и экспериментального исследования

ГП «Институт биохимии биологически
активных соединений

Национальной академии наук Беларуси»,
доктор биологических наук, доцент

Л.И. Надольник



Личную подпись

удостоверяю:

Старший инспектор по кадрам

20

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы В.В. Щур

«Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Диссертационная работа В.В. Щур посвящена важной проблеме – разработке эффективной и точной технологии создания синтетической ДНК. Актуальность данного исследования не вызывает сомнений и обусловлена широким спектром возможного применения искусственных генов для повышения производительности сельского хозяйства, создания новых лекарственных средств, диагностических тест-систем, очистки загрязнений биотехнологическими методами.

Автором предложены и протестированы новые способы основных лабораторных этапов химико-ферментативного *de novo* синтеза молекул двунитевой ДНК: разбиение последовательности ДНК на олигонуклеотидные блоки, получение очищенных олигонуклеотидов, их ферментативная сборка в протяженную ДНК, оценка качества синтетической ДНК с последующей амплификацией и клонированием в плазмидный вектор.

Диссертация выполнена согласно поставленным целям и задачам, имеет научную новизну и практическую значимость. Впервые предложен способ очистки сложной смеси олигонуклеотидов разной длины методом твердофазной экстракции с применением наконечников, заполненных сорбентом известной емкости. Это позволяет одновременно с очисткой выполнять дозирование смеси для последующей сборки ДНК-синтона. Разработана также программируемая методика ферментативной сборки протяженного синтона, включающая сочетанное применение двух способов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы синтеза. Установлен механизм образования побочных продуктов ферментативного синтеза двунитевой ДНК. Предложен способ селективного лигирования целевых синтетических генов в плазмидный вектор. Применение созданной оригинальной технологии химико-ферментативного *de novo* синтеза ДНК позволило уже получить более 40 синтетических генов, востребованных в биотехнологиях и молекулярно-генетических исследованиях.

Следует полагать, что диссертационная работа В.В. Щур представляет собой завершенное научное исследование. Знакомство с авторефератом диссертации и публикациями соискателя позволяет заключить, что диссертационная работа В.В. Щур соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук.

Заместитель директора по научной и инновационной работе
Института физиологии НАН Беларуси, к.б.н.
С.В.Маньковская

05.02.2024г.

Институт биорганической химии НАН Беларуси		
15	02	2024
№	197	



О.А. АСМЕТКО
05.02.2024

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертационной работы 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

Диссертационная работа Щур В.В. посвящена важной проблеме разработке оптимизированной технологии химико-ферментативного синтеза разнообразных последовательностей ДНК. Актуальность исследования связана с необходимостью получения протяженных молекул двунитевой ДНК, которые необходимы при проведении биотехнологических и молекулярно-биологических исследований.

В соответствии с целью исследования соискателем предложен и апробирован новый пяти стадийный способ процесса получения протяженных молекул двунитевой ДНК. Дизайн технологии включает подготовку олигонуклеотидов, синтез из них ДНК с последующей амплификацией и клонированием продукта сборки в плазмидный вектор. Соискателем решена задача получения олигонуклеотидов, их очистки и использования в качестве олигонуклеотидных блоков при синтезе двунитевой ДНК заданной последовательности. Для увеличения предельной длины синтона использован способ ферментативного синтеза ДНК на основе олигонуклеотидных блоков с сохранением точности их последовательности. Разработаны способы контроля сборки синтетической последовательности ДНК из олигонуклеотидных блоков. Важной частью работы стало исследование стабильности в условиях ПЦР олигонуклеотидов с 5'-диметокситритильной защитной группой по 5'-концам двунитевой ДНК.

Полученные Щур В.В. результаты создают научные основы для практического применения технологии химико-ферментативного синтеза разнообразных последовательностей ДНК. В рамках выполнения Государственной программы «Научные технологии и техника» она применена при организации производственного участка по синтезу искусственных генов и библиотек генов для создания диагностически и терапевтически значимых ферментов и моноклональных антител. Результаты исследований, полученные Щур В.В. нашли отражение в 4 научных статьях, входящих в перечень ВАК РФ, и в 1 патенте на изобретение.

Квалифицированное использование автором современных физико-химических, молекулярно-генетических методов исследования и их рациональное использование в соответствии с целью и задачами работы свидетельствует о высоком уровне подготовки диссертантки. Результаты диссертации представляются достоверными. Автореферат отличается ясностью и логичностью изложения, отражает все основные положения, выносимые на защиту, а выводы вытекают из существа полученного материала.

Таким образом, на основании автореферата можно заключить, что диссертация Щур В.В. соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Зав. НИЛ прикладных проблем биологии и биохимического
факультета Белорусского государственного университета,
кандидат биологических наук, доктор наук

В.П. Курченко

Начальник управления
организационной работы и
документационного обеспечения
Н.Б. Черкасская

Институт биоорганической
химии НАН Беларуси
15 02 20 24
№ 198

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Щур Вероники Владимировны «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Тематика представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия диссертации относится к области химического синтеза высокомолекулярных биологически активных молекул. При этом значимой проблемой синтеза таких веществ, в т.ч. ДНК, считается технологическая сторона вопроса, а именно получение необходимых последовательностей нуклеотидов, очистка синтезированного полимера и снижение вероятности возможных ошибок.

В представленном автореферате раскрыты основные положения диссертационной работы, направленной на решение проблемы получения синтетической ДНК в рамках разработки новых способов повышения выхода целевого продукта, снижения содержания в нем примесей и возникновения ошибок.

Автором предложен новый способ очистки смеси олигонуклеотидов перед сборкой днДНК – твердофазная экстракция на сорбенте известной емкости, а также сочетание двух способов сборки днДНК, что повышает длину синтона и обогащает целевой последовательностью продукт. Следует подчеркнуть, что на способ получения смеси очищенных олигонуклеотидов получен патент Республики Беларусь. Преимущество разработанного способа очистки заключается в одновременном дозировании смеси, что нужно для одной реакции сборник синтона.

Значимым аспектом при синтезе ДНК является получение молекул с меньшим количеством возникновения ошибок. Диссертантом предложен способ селективного в отношении укороченных побочных продуктов лигирования целевых генов в плазмидный вектор после установления стабильности 5'-диметоксинитрильной группы и ее влияния на активность Т4 лигазы в реакции сшивания тупых концов двунитевой ДНК.

Раскрыт механизм некорректного отжига концевых нуклеотидов с последующий конкатемерной цепной реакцией, лежащий в основе получения высокомолекулярных примесей. При этом обобщая все выше указанное, можно заключить, что разработана новая лабораторная технология синтеза протяженных ДНК-синтонов, что подтверждается разработкой двух лабораторных регламентов.

Практическая направленность работы заключается в том, что разработанные технологии используются при синтезе двухцепочечной ДНК и могут быть использованы при синтезе искусственных генов и их библиотек, что в последующем может быть реализовано при создании антител, ферментов и т.п.



Работа выполнена в рамках отдельного проекта НАН Беларуси, подпрограммы «Биооргхимия» государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», тема работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь.

По теме работы опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, 6 тезисов докладов и патент Республики Беларусь. Результаты работы представлены и доложены на научных конференциях республиканского и международного уровней.

В целом работа Щур В.В. представляет собой серьезный научный труд. Она выполнена на обширном экспериментальном материале, с использованием современных научных методов. Цель работы четко сформулирована и выливается в ясные и логично обоснованные задачи, ответы на которые дают грамотно сформулированные выводы.

Текст автореферата написан хорошим научным языком, четко и логично, содержит нужную информацию и понятные рисунки. Полученные результаты хорошо обоснованы, имеют теоретическое и практическое значение. Их новизна бесспорна. Считаю, что задачи, обозначенные соискателем для достижения поставленной цели, выполнены, а положения, выносимые на защиту доказаны.

Диссертационная работа Щур Вероники Владимировны является по научной новизне, актуальности, теоретической и практической значимости завершенным квалификационным научным трудом, который в полной мере соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия и сама автор заслуживает присуждения ей искомой степени.

Выражаю свое согласие на размещение отзыва на данный автореферат на сайте Диссертационного совета.

Заведующий кафедрой
фармацевтической химии
Учреждения образования
«Белорусский государственный
медицинский университет»,
к.фарм.н., доцент

Лукашов Р.И.



ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

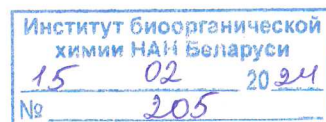
диссертации Щур Вероники Владимировны «РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ДНК» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Щур В.В. относится к новому научному направлению - синтетическая биология (*synthetic biology*), главным элементом которого является проектирование и создание биологических систем с заданными свойствами и функциями, в том числе и не имеющих аналогов в природе. Стандартным подходом получения последовательностей ДНК является рестриктазно-лигазный метод, который используется для разработки и конструирования биологических систем с определенными свойствами. Особенность синтетической биологии состоит в переходе от перемещения нескольких генов между организмами (генная инженерия) к созданию искусственного генома. В перспективе это направление может дать огромный практический выход, от получения биотоплива, бактериального электричества, диагностических средств, фармацевтических препаратов, синтетических вакцин, принципиально новых подходов для борьбы с инфекциями, повышения продуктивности и устойчивости культивируемых растений и животных и многое другое.

Первые успехи синтетической биологии связаны с развитием методологии работы с ДНК. Химико-ферментный метод синтеза олигонуклеотидов с заданной последовательностью позволяет создавать гены для трансгенных микро и макроорганизмов.

Диссертационная работа Щур В.В. и посвящена созданию потенциально автоматизируемой, эффективной технологии, позволяющей получать произвольные последовательности ДНК с использованием именно химико-ферментативного синтеза. В работе предложены и апробированы новые способы реализации пяти стадий процесса: дизайна, подготовки олигонуклеотидов, синтеза из них ДНК с последующей амплификацией и клонированием продукта сборки в плазмидный вектор. Важным составляющим элементом работы является предложенный способ очистки пулов олигонуклеотидных блоков разной длины с помощью метода ТФЭ на обращенно-фазовом (ОФ) сорбенте. Способ позволяет одновременно с очисткой выполнять дозирование смеси, необходимое для проведения одной реакции сборки синтона.

Разработан оригинальный метод программируемой ферментативной сборки синтонов. В диссертации показано, что динамическое светорассеяние может быть использовано в качестве метода наблюдения за ферментативной сборкой двунитевой ДНК в режиме реального времени.



В процессе выполнения диссертационной работы создана оригинальная лабораторная технология химико-ферментативного *de novo* синтеза, позволяющая получать протяженные (до 1600 п.н.) ДНК-синтоны с минимизированной вероятностью возникновения ошибок, которая рекомендована для практического использования в научных и практических целях.

Новизну и практическое значение диссертационной работы подтверждает полученный патент на изобретение.

Разработанная технология использована при *de novo* синтезе двунитевой ДНК 41 синтетического гена общей протяженностью 43 644 п.н. Практический результат получен в рамках выполнения договоров с заинтересованными организациями Республики Беларуси, работающими в области биотехнологии.

Заключая анализ информации, представленной в автореферате кандидатской диссертации «РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ДНК», можно без всякого опасения утверждать, что работа характеризуется высокой степенью новизны, а также практической значимостью в области синтетической биологии.

Соискатель степени кандидата наук Щур Вероники Владимировны по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени.

Главный научный сотрудник НИЛ
биотехнологии кафедры микробиологии
Белорусского государственного
Университета, доктор биологических
наук, профессор

Прокулевич В.А.

Подпись В.А.Прокулевича удостоверяю



Отзыв
на автореферат диссертации **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**

Диссертационная работа В. В. Щур посвящена актуальной проблеме – химико-ферментативному *de novo* синтезу ДНК, что особенно важно в условиях развития нового направления научного познания и инженерии – синтетической биологии.

Целью работы являлась разработка эффективной лабораторной технологии химико-ферментативного *de novo* синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК.

На основе проведенной работы были получены следующие результаты.

- Впервые предложен способ очистки пулов олигонуклеотидных блоков методом твердофазной экстракции на обращенно-фазовом сорбенте известной емкости, который одновременно позволяет осуществлять дозирование смеси, необходимой для проведения одной реакции сборки фрагмента ДНК.
- Разработан метод программируемой ферментативной сборки фрагментов ДНК, основанный на комбинации двух способов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы синтеза, который позволяет получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 т.п.н.) молекулы ДНК за один этап.
- Показано, что динамическое светорассеяние может быть использовано в качестве метода наблюдения за ферментативной сборкой двунитевой ДНК в режиме реального времени.
- Предложен механизм образования в процессе сборки фрагментов ДНК высокомолекулярных побочных продуктов, заключающийся в формировании соединений с идентичными фланкирующими участками в результате некорректного отжига концевых олигонуклеотидов с последующей конкатемерной цепной реакцией.
- Установлена стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и выявлено влияние 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 ДНК-лигазы в реакции сшивания «тупых» концов двунитевой ДНК, что позволило предложить способ селективного по отношению к укороченным побочным продуктам лигирования целевых молекул ДНК в плазмидный вектор.

Автореферат хорошо структурирован и снабжен убедительными данными. Полученные результаты являются оригинальными и новыми. Научные положения работы освещены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах. Полученные результаты широко представлены на конференциях и оформлены в виде патента Республики Беларусь.

Следует отметить, что исследования такого рода впервые проведены в Беларуси, а результаты работы имеют несомненный практический потенциал.



Диссертационная работа Вероники Владимировны Щур является законченным научно-квалификационным исследованием по актуальности, научной новизне и практической значимости, содержанию, методам. Она соответствует требованиям о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, В. В. Щур, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Зав. лабораторией «Центр аналитических и
генно-инженерных исследований»
Института микробиологии НАН Беларуси
кандидат биологических наук, доцент

Л.Н. Валентович



Міністр народнай асветы Р.Н.
уверэна

УЧЭНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Н. А. РОВЕНСКАЯ

13.02.2024

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации 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

Диссертационная работа Щур Вероники Владимировны посвящена разработке новых технологий химико-ферментативного синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК *de novo*.

Научно-практическая значимость и своевременность такого рода исследования не вызывает сомнений, так как оно вносит серьезный вклад в развитие научно-методологической основы синтетической биологии – нового и крайне перспективного направления биологии, формирующегося в Республике Беларусь в соответствии с мировыми тенденциями и необходимостью создания отечественных технологий получения синтетических генов диагностически и терапевтически значимых ферментов и моноклональных антител. Работа соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь и выполнялась в рамках задания ГПНИ, отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси.

Автором проведены обширные экспериментальные исследования с привлечением широкого спектра современных молекулярно-биологических, химических и биохимических методов: ПЦР, клонирование, трансформация, рестрикционный анализ, твердофазный синтез, твердофазная экстракция, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, электрофорез, секвенирование по Сэнгеру, методы светорассеяния. Грамотное и теоретически оправданное применение разноплановых методических подходов позволило автору адекватно решить все поставленные в работе экспериментальные задачи.

Автором впервые разработан эффективный способ очистки и одновременного дозирования смесей олигонуклетидных блоков разной длины с помощью твердофазной экстракции, который ускоряет и удешевляет технологию синтеза ДНК по сравнению с используемыми для этих целей материалоемкими и времязатратными методами ВЭЖХ и электрофореза.

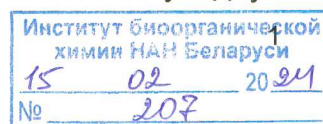
Использование оригинальной комбинации разных вариантов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы синтеза позволило автору создать одноэтапный способ получения протяженных синтонов, обогащенных целевой последовательностью.

Автором получены новые оригинальные данные, на основании которых предложен механизм образования высокомолекулярных побочных продуктов полимеразной цепной сборки, длина которых превышает длину целевого синтона.

Автором экспериментально подтверждена возможность применения методов светорассеяния для наблюдения за сборкой ДНК, которые в отличие от традиционного подхода (электрофорез в агарозном геле) позволяют осуществлять мониторинг процесса в режиме реального времени.

На основании анализа влияния 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов на Т4 лигазу предложен способ селективного лигирования целевых генов в плазмидный вектор в присутствии низкомолекулярных побочных продуктов.

Полученные результаты и разработанные научно-методические подходы в совокупности позволили автору создать оригинальную и более эффективную по сравнению с аналогами лабораторную технологию химико-ферментативного синтеза *de novo* протяженных ДНК-синтонов с минимизированным риском возникновения ошибок. Разработанная технология легла в основу двух



лабораторных технологических регламентов, успешно апробированных при синтезе искусственных генов и создании библиотек генов в рамках мероприятия Государственной программы "Наукоемкие технологии и техника", а также при выполнении хозяйственных договоров с заинтересованными организациями Республики Беларусь.

В пользу несомненной практической значимости, новизны и оригинальности результатов диссертации свидетельствует факт получения патента на изобретение (BY 23440).

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, представленные результаты достоверны и апробированы на 6 научных конференциях, выносимые на защиту положения обоснованы, практические рекомендации и выводы аргументированы и вытекают из экспериментальных данных. По результатам проведенных исследований опубликовано 10 научных работ (в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах).

На основании автореферата можно заключить, что диссертационная работа Щур Вероники Владимировны "Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК" соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

12.02.2024

Заведующий кафедрой биохимии
биологического факультета
Белорусского государственного университета
кандидат биологических наук, доцент

И.В. Семак



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации 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

В настоящее время синтетическая биология представляет собой одно из самых актуальных и динамически развивающихся направлений научных изысканий. Прогресс в развитии подходов инженерного конструирования, используемых для модификации существующих биологических систем и создания новых, не только принесет пользу фундаментальной науке, но и обеспечит ученых новыми инструментами для решения практических задач в таких областях, как экология, медицина, энергетика и фармакология. Именно достижения синтетической биологии становятся основой для сдвига в фундаментальных биологических исследованиях от анализа природных систем к созданию искусственных организмов с желаемым фенотипом. Именно это направление и представляет сферу научных интересов Щур В.В., на основании чего можно заключить, что представленная к защите работа является, безусловно, актуальной и имеет как высокую научную, так и практическую значимость.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (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 гг. (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. №156): п. 2 “Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: системная и синтетическая биология”. Работа посвящена решению весьма важной научно-практической задачи – разработке эффективной лабораторной технологии химико-ферментативного *de novo* синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК, востребованных в биотехнологии и молекулярно-биологических исследованиях.

Объекты и предмет исследования вполне аргументированы. Методология и использованные в работе методы и подходы не вызывают сомнений. Работа выполнена на базе авторитетной лаборатории ГНУ “Институт биоорганической химии НАН Беларуси”.

Теоретическая значимость работы заключается в обосновании использования динамического светорассеяния для наблюдения за ферментативной сборкой двунитевой ДНК в режиме реального времени, установлении стабильности 5'-диметокситритильной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и влияния 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции сшивания тупых концов двунитевой ДНК, описании механизма образования в процессе сборки синтонов высокомолекулярных побочных продуктов.

Практическая значимость исследования связана с созданием новой лабораторной технологии *de novo* синтеза протяженных ДНК-синтонов с минимизированной вероятностью возникновения ошибок, на основании которой создано и утверждено 2 лабораторных технологических регламента, используемых при синтезе искусственных генов и библиотек генов, в том числе для создания диагностически и терапевтически значимых ферментов и моноклональных антител.

Положения, выносимые на защиту, а также выводы работы соответствуют цели, задачам и фактическому материалу исследования. Все материалы диссертации полно и всесторонне опубликованы.

На основании вышеперечисленного считаю, что диссертационная работа Щур Вероники Владимировны соответствует требованиям ВАК, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Доцент кафедры биохимии
Белорусского государственного университета,
к.б.н., доцент

Начальник управления
организационной работы и
документационного обеспечения
Н.Б. Черкасская
2024



Губич О.И.
Институт биоорганической
химии НАН Беларуси
15 02 2024
№ 208

Отзыв на автореферат
диссертации 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

Согласно автореферату, диссертационная работа посвящена совершенствованию современной автоматизированной технологии химико-ферментативного синтеза получения произвольных последовательностей ДНК. В ходе работы соискатель приобрел уникальный опыт решения этой современной задачи из области синтетической биологии и установил ряд интересных фактов, обозначенных в разделе основные научные результаты диссертации. В частности, отмечу результаты, касающиеся методик применения рассеяния лазерного излучения для он-лайн мониторинга роста цепи ДНК и особенностей влияния 5'-диметоксинитрильной группы на активность T4 лигазы, что важно для оптимизации процесса получения синтетических генов.

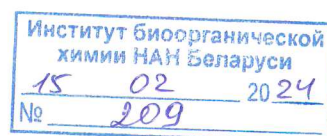
. Результаты диссертации представлены в 11 работах, включающих 4 статей в рецензируемых научных журналах, 1 патент.

Замечания по автореферату включают неудачные выражения (стр. 3, «практически бесконечным (имя ввиду операции с фрагментом ДНК конечной длины – Я.В.)», «создание потенциально автоматизируемой» (системы синтеза олигонуклеотидов из активированных мономеров без автоматизации не работают), неудачную формулировку положения на защиту и соответствующего результата (до опытов соискателя было известно, что прогресс полимеризации ДНК можно наблюдать по светорассеянию).

Однако эти замечания носят уточняющий характер и не влияют на мою положительную оценку диссертации и значимость полученных результатов. Рекомендую присудить Щур В.В. ученую степень кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

К.х.н., доц.

Фалетров Я.В.



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **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

Синтетическая биология представляет собой быстро развивающуюся отрасль биотехнологии, которая способна коренным образом изменить многие аспекты современной жизни. Прогресс в данной области исследований неразрывно связан с совершенствованием методов химико-ферментативного синтеза и манипуляций с ДНК. В связи с этим оптимизация уже существующих и разработка новых технологий получения искусственных генов является актуальной задачей.

Диссертационная работа Щур В.В. посвящена созданию потенциально автоматизируемой, эффективной технологии, позволяющей получать протяженные последовательности ДНК. Автором предложены и апробированы новые способы реализации основных стадий процесса, включая получение пулов очищенных олигонуклеотидов, ферментативный синтез днДНК, амплификацию и интеграцию синтона в плазмидный вектор. Впервые показана возможность использования методов светорассеяния для контроля ферментативного синтеза днДНК из олигонуклеотидных блоков в режиме реального времени, установлена природа высокомолекулярных побочных продуктов сборки днДНК и предложен механизм их образования, изучена стабильность в условиях ПЦР олигонуклеотидов с 5'-диметокситритильной защитной группой и влияние защиты на активность Т4 лигазы в реакции лигирования днДНК. Полученные соискателем результаты отличаются научной новизной и имеют высокую прикладную значимость. Практическим воплощением разработанной технологии явился синтез 41 гена общей протяженностью 43644 п.н.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, 6 тезисов докладов, получен патент на изобретение. Результаты исследований неоднократно представлялись на международных конференциях.

Считаю, что диссертационная работа Щур Вероники Владимировны «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК» соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени.

Замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

Заведующий кафедрой химии и физики
УО «Гродненский государственный
аграрный университет», доктор
биологических наук, профессор

 А.Ф.Макарчиков

12.02.2024


От. зав. к. по химии *С.С. Заверю* *В.В. Васильева* *В.В.*

