

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Бубнова Дмитрия Михайловича
на тему: «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других
представителей порядка *Enterobacteriales*»
по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология
(биологические науки)

В последние годы очевидным и неоспоримым фактом является стремительный прогресс в геномной инженерии различных организмов и бактерий в частности. Указанное направление весьма актуально как для фундаментальных исследований в области микробиологии и биотехнологии, так и для практической деятельности в этих сферах, поскольку в обоих случаях необходимыми являются работы по созданию штаммов с новыми свойствами, например, штаммов-продуцентов или штаммов, способных расти на требуемых исследователям субстратах. Несмотря на появляющиеся в этой области методы, в случае бактерий технологии на основе Red-рекомбинации бактериофага λ не только не утратили актуальность, но и предоставляют новые возможности для усовершенствования существующих подходов и решения широкого круга задач. Примером этого является рецензируемая работа Дмитрия Михайловича Бубнова, посвященная созданию и оптимизации технологии для интеграции немаркированных конструкций в геном бактерий. Необходимость в подобного рода работах весьма высока. **Актуальность исследования не вызывает сомнения.**

Работа написана по традиционному плану и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы», «Приложения», изложена на 153 страницах и содержит 5 таблиц и 29 рисунков. В списке цитированной литературы содержится 185 источников.

Тщательный анализ работы позволяет заключить, **что положения, выносимые на защиту, научные выводы и рекомендации, сформулированные автором, хорошо обоснованы и не вызывают сомнения.** Диссертационная работа спланирована и описана логично и

представляет собой современное, важное как с теоретической, так и с практической точек зрения исследование. Все поставленные автором работы задачи решены. Основные достижения отражены в выводах, которые не являются перечислением полученных результатов, а представляют собой продуманные и хорошо сформулированные тезисы, основанные на проведенной экспериментальной работе. Ни один из выводов не вызывает критических замечаний.

Обзор литературы хорошо написан, содержит достаточное количество информации, необходимой для понимания работы. Прочитрованы статьи, в которых отражена история развития исследований и современные достижения. Можно отметить весьма хороший стиль изложения материала.

Работа выполнена с применением современных методов микробиологии и биотехнологии, а также с использованием программного обеспечения. Проведена статистическая обработка полученных результатов. Сказанное определяет их **достоверность**.

Очень логично и четко сформулированы задачи: разработать стратегию, создать на основе новой стратегии технологии, адаптировать и расширить технологию и ее использование.

Получены новые впечатляющие результаты, создана технология интеграции немаркированных конструкций в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции.

Следует отметить, что при использовании методов негативной селекции частоты спонтанных мутаций в маркере имеют ключевое значение. В связи с этим стратегия селекции, созданная в данной работе и характеризующаяся предельно низкой скоростью возникновения спонтанных мутантов, имеет весьма высокую ценность как для выполнения прикладных задач, так и в фундаментальных исследованиях.

Работа хорошо иллюстрирована схемами, которые очень помогают понять логику исследования.

Тот факт, что созданная технология не обнаруживает зависимости от систем метилирования и рестрикции позволяет предполагать ее дальнейшее развитие и применение в фундаментальных исследованиях, а также использование в медицине. **Практическое значение полученных результатов может быть весьма велико.**

К сожалению работа не лишена ряда недочетов, которые необходимо отметить. Могу предположить, что, скорее всего, отмеченные недостатки связаны с дефицитом времени у автора. Приведу примеры некоторых из них.
Замечания:

Ссылка №40, из которой следует узнать о происхождении штамма В3996 (Таблица1, стр. 50) неполная и не предоставляет нужной информации. В этой же таблице в графе «источник и ссылка» для некоторых штаммов ссылки отсутствуют.

На рисунке 22 (А, Б и В) отсутствуют данные об увеличении, что весьма затрудняет понимание результата.

Описание выделения ДНК лучше было бы вынести в отдельный раздел, а не включать в раздел 2.2. «Ферменты и наборы».

Рисунок 24 «Проверка интеграции линейных кассет в целевые геномные локусы с помощью локус-специфичной ПЦР» неудачно скомпонован. Так, на изображениях гелей с результатами экспериментов по амплификации не указан размер маркеров, а масштаб отдельного изображения маркера, где размеры приведены, несопоставим с масштабом фотографий гелей. Более того, в подписи к рисунку содержится ошибка. Несколько способствует пониманию, однако, единообразие размера получаемых продуктов.

Следует отметить, что апробация работы была проведена Дмитрием Михайловичем только на двух школах, обе проходили в 2018 году, когда основные результаты, по всей вероятности, еще не были получены (и уж точно не были опубликованы) что на мой взгляд дает основание посоветовать

автору с большей активностью представлять свою работу научной общественности.

Вопросы:

В каких экспериментах был использован штамм В3996? Упоминания об этом не удалось найти в тексте диссертации.

Сам ли автор проводил эксперименты по разделению аминокислот и определению треонина и триптофана с использованием системы Waters Alliance 2696 и рефрактометра?

Расшифровка сокращения ВЭЖХ отсутствует в списке сокращений, в то же время в этот список введена расшифровка «*E. coli* – *Echerichia coli*», но отсутствуют соответствующие сокращения для других видов микроорганизмов, которые в тексте диссертации неоднократно поименованы полным видовым и родовым названием. Какой логикой пользовался автор при составлении списка сокращений?

Использовал ли автор для верификации получаемых конструкций метод секвенирования последовательностей?

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, а скорее являются советами и пожеланиями автору при работе над рукописями в будущем.

В целом диссертация написана хорошим языком, легко и с интересом читается, в тексте видна заинтересованность автора своей работой. Автореферат и опубликованные статьи достаточно полно отражают содержание работы.

Диссертационная работа «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales*» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание

ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бубнов Дмитрий Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

профессор, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Калебина Татьяна Сергеевна



подпись 27.11.2023 дата

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.03-Молекулярная биология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет.

Тел.: +7 (495) 939-50-75; e-mail: ka

Подпись Калебиной Т. С. заверяю

