

## ОТЗЫВ

на автореферат Д. М. Бубнова,  
«Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli*  
и других представителей порядка *Enterobacteriales*»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.11 – микробиология, 1.5.6 – Биотехнология

Диссертационная работа Дмитрия Михайловича Бубнова посвящена актуальной проблеме микробиологии, молекулярной биологии и генетики микроорганизмов — созданию инструментов на основе системы Red рекомбинации бактериофага  $\lambda$  для интеграции немаркированных конструкций в бактериальную хромосому. Впервые применена комбинация гена репрессора *cI* фага  $\lambda$ , генов токсина *hok* и хлорамфениколацетилтрансферазы *cat* под контролем промоторов  $P_R/P_L$ , репрессируемых белком *C1*, для осуществления негативной селекции в процессе интеграции протяжённых немаркированных фрагментов ДНК. Расположение гена *cat* под контролем промотора  $P_L$  позволяет отбирать мутантные клоны, потерявшие хромосомально интегрированный ген *cI* по устойчивости к хлорамфениколу. При этом ген токсина *hok* под контролем  $P_R$ , расположенный в одном локусе с геном *cI*, ограничивает спонтанное появление устойчивых к хлорамфениколу мутантов. В результате приблизительно 50% всех спонтанных мутантов, выживающих в условиях негативной селекции, несут делецию всей кассеты *cI-hok* вместе с прилегающими областями хромосомы. Последнее позволяет сделать вывод о том, что эффективность стратегии негативной селекции достигает предельно возможного значения.

В работе показано, что предельный размер фрагментов ДНК, встраиваемых с помощью Red-рекомбинации ограничен из-за работы системы рестрикции в клетке-реципиенте (в работе продемонстрирована зависимость эффективности интеграции протяженных фрагментов ДНК в зависимости от наличия в них сайтов узнавания системой EcoKI) и может быть значительно увеличен за счет использования генов, кодирующих

антирестрикционные белки. Наибольшую эффективность в поставленных экспериментах продемонстрировал ген *osr* бактериофага T7, коэкспрессия которого совместно с генами Red позволила увеличить эффективность интеграции неметелированных фрагментов ДНК более, чем на три порядка.

Также в работе сконструирован управляемый ориджин репликации на основе ориджина pBR322 и промотора P<sub>T5lac</sub>, позволяющий поддерживать плазмиду в клетках при культивировании в безлактозной среде и элиминировать плазмиду, используя среды с лактозой или ИПТГ. Сконструированный ориджин репликации позволяет проводить работы в широком диапазоне температур, что делает его удобным инструментом при создании вспомогательных плазмид. Помимо экспериментов в клетках *E. coli*, проведенных для подробной охарактеризации и оптимизации системы Red-рекомбинации с маркерами позитивной и негативной селекции, были сконструированы штаммы-продуценты L-треонина на основе клеток *E. coli*, а также были получены мутантные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* и *Pantoea ananatis*.

Представленная диссертационная работа по новизне, теоретической и практической значимости, адекватности используемых методов, достоверности результатов и выводам отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени Ломоносова к кандидатским диссертациям и соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени Ломоносова, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11 Микробиология, 1.5.6 Биотехнология.

с.н.с. лаборатории  
молекулярной генетики МФТИ,  
к.б.н. Баженов С.В.

Тел.: +7(9

e-mail: ba



ПОДПИСЬ РУКИ  
ЗАВЕРЯЮ:  
Администратор канцелярии  
Административного отдела  
О. А. КОРАБЛЕВА

Баженов  


