



ՀԱՍՏԱՏՐԱԿԱՆ ԵՄ
ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի տնօրեն՝

Ա. Առաքելյան
«04» դեկտեմբերի 2023 թ.

ԱՌԱՋԱՏԱՐ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԾԻՔ

Անի Ռոբերտի Սաղաթելյանի «*Thermus scotoductus* K1 շտամի ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի հետերոլոգիական էքսպրեսիան, բնութագրումը և կենսատեխնոլոգիական ներուժը» թեմայով Գ.00.07 «Միկրոբիոլոգիա, կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման համար ներկայացված ատենախոսության վերաբերյալ

Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը:

Թերմոֆիլ (ջերմասեր) մանրէների կենսաբազմազանության ուսումնասիրության կարևորագույն պատճառներից է մենահատուկ առանձնահատկություններով օժտված կենսատեխնոլոգիական կիրառման հեռանկար ունեցող մանրէների և դրանց հիմքով նոր արդյունավետ տեխնոլոգիաների մշակումը: Հայտնի է, որ աերոբ ասպորոգեն քեմոօրգանոտրոֆ բակտերիաները, մասնավորապես *Thermus* ցեղի ներկայացուցիչները, հայտնաբերվում են երկրաջերմային հանքային աղբյուրներում, օժտված են ջերմային սթրեսին դիմակայելու ճկուն մեխանիզմներով և համարվում են կենսատեխնոլոգիական կիրառություն գտած բազմաթիվ ֆերմենտների, այդ թվում՝ ջերմակայուն պոլիմերազների ակտիվ արտադրիչներ: Վերջիններս, պայմանավորված ռեպլիկացիայի և ռեպարացիայի գործընթացում գենոմի ամբողջականության պահպանման կարևոր կենսական դերով, կիրառվում են ԴՆԹ-ի կլոնավորման, սեքվենավորման, նշադրման և այլ տեխնոլոգիաներում: Հատկանշական է նաև մենահատուկ հատկանիշներ ունեցող ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազների կիրառումը ախտորոշիչ մեթոդների մշակման և բարելավման տեսակետից: Հետևաբար, այդպիսի ԴՆԹ պոլիմերազների հայտնաբերումը ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի արդի հիմնախնդիրներից է:

Հարկ է նշել նաև ներկայացված ատենախոսական աշխատանքի արդիականությունը՝ կապված կենսատեխնոլոգիական առումով խոստումնալից շտամների

հայտնաբերման և բնութագրման հետ, ինչը կարևոր է գործնական նշանակություն ունեցող հետագա մշակումների համար:

Թեմայի նպատակը և խնդիրները:

Աշխատանքի նպատակն է եղել Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի միկրոբիոտայի կազմի ուսումնասիրումը, այդ աղբյուրից մեկուսացված *T. scotoductus* K1 ջերմասեր բակտերիայի I-տիպի ԴՆԹ-պոլիմերազի ռեկոմբինանտ ֆերմենտի ստացումը, բնութագրումը և կիրառական ներուժի բացահայտումը:

Աշխատանքն իրականացնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- աճեցման և աճեցումից անկախ (մոլեկուլային) մեթոդների կիրառմամբ ուսումնասիրել երկրաջերմային աղբյուրների միկրոբիոտայի տաքսոնոմիական բազմազանությունը, մեկուսացնել և ֆենոտիպական, գենոտիպական ու ֆիլոգենետիկական հատկանիշների հիման վրա նույնականացնել *Thermus* ցեղին պատկանող բակտերիաներ:
- Մեկուսացված *T. scotoductus* K1 շտամի գենոմի վերլուծությամբ վերծանված I-տիպի ԴՆԹ պոլիմերազ կոդավորող գենը կլոնավորել մեզոֆիլ տեր-օրգանիզմում՝ ինդուկցիոն մեխանիզմով առավելագույն քանակով թիրախային սպիտակուց ստանալու համար:
- Ուսումնասիրել մաքրված սպիտակուցի հիմնական ֆիզիկաքիմիական (օպտիմալ ջերմաստիճան, միջավայրի pH, իոնների ազդեցություն, ջերմակայունություն) և գործառնության (ՊՇՌ իրականացնելու կարողություն, ճշգրտություն) հատկանիշները:
- Մաքրված սպիտակուցի՝ ՊՇՌ ամպլիֆիկացման ռեակցիաներում կիրառման համար բարելավել ռեակցիոն խառնուրդի բաղադրիչների և ռեակցիայի իրականացման պայմանները:
- Անջատված պոլիմերազի հիմքով մշակել ՊՇՌ տեխնոլոգիայի փորձարարական մոդել:

Ստացված փաստերի և եզրակացությունների գնահատականը:

Աշխատանքում Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացվել է ասպորոգեն թերմոֆիլ մանրէային կուլտուրա և պոլիֆազային մոտեցմամբ նույնականացվել է որպես *T. scotoductus* տեսակին պատկանող մանրէ: Կատարվել է շտամի ֆենոտիպային հատկանիշների, գենոմի խորը և բազմակողմանի *in silico* վերլուծություններ: Ստացված արդյունքների հիման վրա կառուցվել է ֆիլոգենետիկ ծառը, վերծանվել են ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի կոդավորող գենի նուկլեոտիդային և սպիտակուցի ամինաթթվային հաջորդականությունները: Հաջորդիվ, իրականացվել է

սպիտակուցային հաջորդականության պահպանմամբ ԴՆԹ պոլիմերագ 1-ի գենի կոդոնային բարելավմամբ բարձր մաքրությամբ ռեկոմբինանտ ֆերմենտային սպիտակուցի ստացում և վերջինիս ՊՇՌ տեխնոլոգիայի փորձարարական մոդելի մշակում՝ տարաբնույթ (տարբեր տոկոսային ԳՑ պարունակող գոնոմային և պլազմիդային) ԴՆԹ կադապարների կիրառմամբ: Աշխատանքի արդյունքները թույլ են տվել գնահատել պոլիմերագի ՊՇՌ իրականացնելու ունակությունները: Կատարվել է պոլիմերագի որոշ հատկանիշների (ջերմակայունության (thermostability), ճշգրտության (fidelity), յուրահատկության (specificity), արդյունավետության (efficiency)) վերլուծություն: Ստացված արդյունքները հնարավորություն են տվել եզրակացնել, որ ռեկոմբինատ TsK1 ԴՆԹ պոլիմերագը բարձր արդյունավետությամբ ամպլիֆիկացնում է առնվազն 2,5 հ.ն.գ. չափով պրոդուկտներ, ինչպես 68°C, այնպես էլ 72°C-ում շղթայի երկարացման դեպքում: TsK1 ԴՆԹ-պոլիմերագը երկու անգամ ավելի ճշգրիտ է աշխատում, քան Taq պոլիմերագը, TsK1 ԴՆԹ-պոլիմերագի կիրառմամբ արդյունավետ ՊՇՌ իրականացման համար մշակված օպտիմալ աշխատանքային բուֆերի կազմը հետևյալն է՝ 10 մՄ Tris-HCl, pH 9.0, 50 մՄ KCl, 0.1% Triton X, Mg²⁺ իոնի լրացուցիչ 3 մՄ և 10% գլիցերոլի ավելացմամբ:

Արենախոսության գիտամեթոդական մակարդակը:

Անի Սաղաթեյանի աշխատանքը կատարված է բարձր մակարդակով՝ ժամանակակից գիտական մեթոդների կիրառմամբ: Ատենախոսական աշխատանքում հիմնավորված է հետազոտության արդիականությունը, կատարված է թեմային առնչվող անհրաժեշտ գրականության վերլուծություն: Սահմանված են հետազոտության նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքում կիրառվել են կենսահնֆորմատիկայի, մոլեկուլային կենսաբանության, կենսաքիմիայի և հետազոտական այլ եղանակներ: Կատարված է արդյունքների ամբողջական վերլուծություն և արված են համապատասխան եզրակացություններ: Այսպիսով՝ հաստատվում է, որ աշխատանքն իր խորությամբ, հետազոտությունների ծավալով, արդյունքների նորույթով, գործնական արժեքով հանդիսանում է ինքնուրույն, ավարտուն գիտական աշխատություն, որն էական ներդրում է կենսաբանության՝ մասնավորապես մանրէաբանության, գենետիկայի, կենսատեխնոլոգիայի, ինչպես նաև կենսաբժշկության բնագավառներում:

Արենախոսության գործնական նշանակությունը:

Ներկայացված ատենախոսական աշխատանքի արդյունքներում ձեռք բերված թերմոֆիլ *Thermus scotoductus* K1 շտամը, որն ավանդադրվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ MDC 11681 համարի և շիֆրի ներքո, կարող է կիրառվել որպես օբյեկտ/մոդել տարատեսակ ուսումնասիրությունների համար: Հատկանշական է դրա ներուժը ԴՆԹ պոլիմերագի արտադրության համար: Վերջինս իր մի շարք առանձնահատկությունների շնորհիվ կարող է կիրառվել ախտորոշիչ թեստերի

մշակման գործընթացում՝ արդյունավետ իրականացնելով դասական և մուլտիպլեքս ՊՇՌ:

Սեղմագրի համապատասխանությունն ատենախոսության հիմնական դրույթներին:

Հեղինակն ունի 17 գիտական տպագրված աշխատանք՝ 6 հոդված տեղական և միջազգային գիտական ամսագրերում, 3 գրքի գլուխներում և միջազգային գիտաժողովների 8 թեզիսներում:

Տպագրված գիտական աշխատանքներն արտացոլում են ատենախոսության հիմնական դրույթները: Սեղմագիրը համապատասխանում է ատենախոսության բովանդակությանը:

Հարկ ենք համարում նշել ատենախոսական աշխատանքի մասին որոշ նկատառումներ.

1. Աշխատանքի համատեքստում ատենախոսի կողմից ուսումնասիրվող *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի ճշգրտության որոշման մեթոդն ունի սահմանափակումներ: Հեղինակի կողմից չի հիմնավորվել գրականության մեջ առկա *OneTaq*, *Phusion* և *Taq* պոլիմերազների ճշգրտության համեմատական տվյալները հեղինակի կողմից ստացված մուտանտ գաղութների վերլուծության տվյալների (*Taq*-2,40%, *OneTaq*-2.39%, *Phusion*-0.7792%) հետ: Հաշվի առնելով վերը նշվածը՝ *TsK1* ԴՆԹ և *Taq* պոլիմերազների միջև կրկնակի տարբերության վերաբերյալ պնդումը հավելյալ վալիդացման կարիք ունի:
2. Գրական ակնարկում (տես՝ 1,3 բաժին) տարաբնույթ ԴՆԹ պոլիմերազների հայտնաբերումը և բնութագրումը շարադրված է հիմնականում մեկ հեղինակի (*Terpe*, 2013) աշխատանքի հիման վրա, որը անընդմեջ վկայաբերվում է հերթափոխ պարբերություններում:
3. Որոշ նկարներում սխալանքի գծերը բացակայում են կամ վատ են երևում (նկար 43, 47), նկատվել են իմաստը չփոփոխող վրիպակներ:
4. Որպես ցանկություն՝ քանի որ հեղինակի կողմից ուսումնասիրվող պոլիմերազի աշխատանքի օպտիմալ ջերմաստիճանը 68°-75° է, ապագա աշխատանքներում հետաքրքիր կլիներ ուսումնասիրվել *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի արդյունավետության ներուժը իզոթերմալին ամպլիֆիկացիաների այն տեխնոլոգիաներում, որոնք պահանջում են կայուն 65-68° ջերմաստիճան (օրինակ՝ ԴՆԹ-ի ամպլիֆիկացման արդյունավետության գնահատումը հանգույցով միջնորդավորված իզոթերմալին ամպլիֆիկացման (loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) մեթոդով:

Եզրակացություն

Անի Ռոբերտի Սաղաթեյանի «*Thermus scotoductus* K1 շտամի ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի հետերոլոգիական էքսպրեսիան, բնութագրումը և կենսատեխնոլոգիական ներուժը» թեմայով կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման նպատակով ներկայացված ատենախոսությունը հանդիսանում է բարձր որակավորում ունեցող գիտական աշխատություն: Այն լիովին համապատասխանում է ՀՀ-ում գիտական աստիճանաշնորհման կանոնակարգի 7-րդ կետով թեկնածուական ատենախոսություններին ներկայացվող պահանջներին և հեղինակն արժանի է կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի աստիճանի շնորհմանը Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ:

Ատենախոսական աշխատանքը քննարկվել է և կարծիքը հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտխորհրդի նիստում (արձանագրություն թիվ 14, 01 դեկտեմբերի 2023 թ.):

Նիստը նախագահում էր ՄԿԻ գիտխորհրդի նախագահ՝ կ.գ.դ. Ա. Առաքելյանը, նիստի քարտուղար՝ կ.գ.թ. Զ. Խաչատրյան: Նիստին մասնակցում էին ՄԿԻ գիտխորհրդի անդամներ՝ կ.գ.դ. Լ. Եպիսկոպոսյան, կ.գ.դ. Զ. Կարալյան, կ.գ.թ. Ռ. Զախարյան, կ.գ.թ. Հ. Զաքարյան, կ.գ.դ. Ե. Կարալովա, կ.գ.դ. Կ. Մայիլյան, կ.գ.թ. Գ. Մանուկյան, կ.գ.թ. Գ. Մկրտչյան, կ.գ.թ. Ա. Սեդրակյան, կ.գ.թ. Վ. Վարդանյան, կ.գ.թ. Գ. Առաքելով, Ն. Մուրադյան:

Բջջի կենսաբանության և վիրոլոգիայի լաբորատորիայի վարիչ՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Զ. Կարալյան

Բջջի կենսաբանության և վիրոլոգիայի լաբորատորիայի ավագ գիտաշխատող՝ կ.գ.թ. Հ. Ավագյան

Զ. Կարալյանի և կ.գ.թ. Հ. Ավագյանի ստորագրությունները հաստատում են՝

ՀՀ ԳԱԱ ՄԿԻ գիտքարտուղար, կ.գ.թ. Զ. Խաչատրյան

