

29.11.2022 № 10341-450/101

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института аналитического приборостроения
Российской академии наук (ИАП РАН)
доктор технических наук

А.А. Евстапов

«28» октября 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ИНСТИТУТА АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РАН по диссертационной работе Петрова Дмитрия Григорьевича «Разработка экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики»

Информация о соискателе и диссертационной работе

В 2012 г. Петров Дмитрий Григорьевич окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский политехнический университет» по направлению «Техническая физика». В 2015-2019 гг. соискатель проходил обучение в аспирантуре на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института аналитического приборостроения Российской академии наук» (ИАП РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Петров Дмитрий Григорьевич работал в должности заведующего сектором в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Института аналитического приборостроения Российской академии наук» в лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа.

Научный руководитель – Курочкин Владимир Ефимович доктор технических наук, профессор, руководитель научного направления Института,

заведующий лабораторией методов и приборов иммунного и генетического анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук» (ИАП РАН).

Работа выполнена в ИАП РАН.

Актуальность темы исследования

Молекулярные методы анализа нуклеиновых кислот (НК), такие как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), являются самыми распространёнными способами обнаружения, идентификации и/или

количественного определения вирусов и бактерий в клинических образцах, пищевых продуктах, образцах окружающей среды, при проведении археологических и судебных исследований. В процессе многолетней практики применения методов ПЦР для анализа различных проб многократно подтверждена определяющая роль подготовки образцов перед молекулярно-генетическим анализом.

В настоящее время широкое распространение получили методы выделения нуклеиновых кислот (НК) на твердофазных сорбентах: стекловолоконных мембранах и магнитных сорбентах. Во многом популярность этих методов обусловлена их простотой, доступностью и отсутствием токсичных реагентов. Как следствие, на основе таких методов создан ряд серийно выпускаемых приборов для автоматизированной пробоподготовки НК. Сам процесс выделения и очистки НК состоит из одних и тех же стадий – сорбции НК, промывки (для удаления компонентов, мешающих ПЦР), сушки сорбента от остатков промывочного реагента и элюирования НК в раствор для анализа. От результата каждой из этих стадий зависит эффективность всей процедуры пробоподготовки (т.е. количество и качество очистки НК, необходимое для получения достоверных результатов последующего ПЦР-РВ анализа).

Многообразие природы и составов анализируемых проб, содержащих разные виды и количества примесей, ингибирующих ПЦР-РВ, обуславливает необходимость подбора условий проведения каждой стадии пробоподготовки.

Таким образом, представляется актуальной разработка автоматизированной программируемой установки, позволяющей экспериментально моделировать, оценивать и изучать каждую из стадий выделения НК (сорбцию, промывку, сушку и элюирование), оценивать их совместимость и соответствие требованиям к качеству и количеству выделяемого генетического материала. Такая установка упрощает и ускоряет процесс создания или адаптации методик (протоколов) автоматического выделения НК. Кроме того, становится возможным оценить границы применимости каждой методики для анализа определённого вида проб, при изменении составов реагентов – это позволяет создавать опытные образцы автоматизированных приборов с предсказуемыми границами применимости и – при необходимости модифицировать уже существующие методики, добиваясь повышения их эффективности. Для удобства работы, а также для улучшения воспроизводимости выделения НК на созданной установке, необходимо разработать программное обеспечение (ПО) позволяющее управлять

функциональными узлами и элементами установки, с целью изменения режимов выделения НК.

подавляющая часть приборов и систем для автоматизированного выделения НК построена на базе стандартных планшетов и одноразовых картриджей. «Планшетная» реализация выделения НК имеет преимущества перед «картриджной» в производительности и стоимости одного выделения. Среди недостатков, в основном выделяются – сложность защиты от контаминации образцов и, как правило, достаточно малое разнообразие видов обрабатываемых проб (например, только клинические образцы такие как кровь, моча, плазма и др.). В экспериментальной работе предпочтение было отдано реализации выделения НК из жидких проб на картридже, так как в исследовательских задачах не требуется большая производительность, а необходима высокая степень защиты от контаминации образцов.

Одним из направлений работы являлось создание дополнительных модулей для разработанной установки, позволяющих повысить эффективность выделения НК с помощью температурного или ультразвукового (УЗ) воздействий на сорбцию НК, при выделении из модельных растворов, и определения оптимальных параметров этих воздействий. Модельная проба – это водный раствор плазмиды *m.tuberculosis*, объект ДНК выбран не случайно, так как помимо высокой изученности данной плазмиды она характеризуется высокой стабильностью при хранении.

В работе апробирован способ проточного выделения НК под воздействием УЗ. Определены условия удерживания магнитных частиц в потоке, а также параметры системы позволяющие осуществлять смену реагентов необходимых для выделения НК. Полученные данные свидетельствуют о возможности повышения эффективности выделения НК с помощью многократного пропускания пробы через удерживаемый в потоке под воздействием УЗ магнитный сорбент. Результаты по апробации способа проточного концентрирования сформулированы в виде перспективного предложения для разработки методик и приборов для выделения НК из жидких проб большого объема (в перспективе до 1 л).

Разработанная экспериментальная установка имеет самостоятельное значение и в то же время является необходимым инструментом для успешного проектирования (модернизации) автоматизированных систем пробоподготовки и анализа НК.

Основные научные результаты и их новизна

Научная новизна:

1. Впервые показано влияние изменения длительности отдельных стадий выделения НК в автоматическом режиме на результат всей пробоподготовки.
2. Впервые создана экспериментальная установка, позволяющая проводить выделение НК под воздействием УЗ (с частотой 2,64 МГц) в диапазоне интенсивностей от 1,2 до 3,0 Вт/см², обеспечивающая эффективность выделения выше 85% без применения температурного воздействия.
3. Показан способ двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК с применением проточного метода выделения на магнитном сорбенте под воздействием УЗ.

Практическая значимость:

1. Созданная установка, позволяет определять и изменять параметры выделения НК на картридже в автоматическом режиме, такие как:

- скорость дозирования (до 3 мл/сек) и количество реагентов, необходимых для выделения НК из проб объёмом до 5 мл;
- температуру в диапазоне от комнатной до 90°C;
- величину УЗ воздействия от 1,2 до 3,0 Вт/см², с частотой 2,64 МГц;
- длительность различных стадий выделения НК.

Это позволяет создавать новые методики или увеличивать эффективность действующих методик автоматизированного выделения НК из жидких проб на картриджах.

2. Показано, что управление параметрами выделения НК из модельных проб, такими как: длительность стадий, расход и интенсивность перемешивания реагентов, интенсивность температурного и ультразвукового воздействий на различные стадии, позволяет спрогнозировать результативность выделения в целом и достичь более, чем 90% – ный выход ДНК.

3. Показан способ проточного выделения НК под воздействием УЗ из модельных проб объёмом 10 мл, который позволяет достичь двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК в элюате, в сравнении с непроточным выделением НК из такой же пробы, тем самым обеспечивается увеличение репрезентативности пробы.

4. Результаты работы успешно применены при разработке новых и повышении эффективности действующих методик выделения НК на Комплексе для выделения нуклеиновых кислот, при выборе условий и режимов автоматического выделения НК.

Личный вклад автора

1. Разработка экспериментальной установки для выделения НК в автоматическом режиме.

2. Разработка методики автоматического выделения НК на созданной экспериментальной установке.

3. Создание экспериментальной установки на базе акустического фильтра для выделения НК в проточном режиме.

4. Определение параметров команд для управления автоматическим выделением НК на экспериментальной установке.

5. Создание рабочих протоколов автоматического выделения НК для Комплекса КВНК

Апробация результатов диссертационного исследования

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на пяти международных конференциях (Армия 2018, Армия 2019, Армия 2020, Армия 2021, Экобалтика), 2-х всероссийских с международным участием (Физика-А 2018, Физика-А 2019), а также на конференциях учреждений, проводимых Минобороны России.

Результаты экспериментальных исследований легли в основу создания методики работы Комплекса для выделения нуклеиновых кислот с помощью одноразовых картриджей (Комплекс КВНК), востребованного Государственным заказчиком, который с 2015 года принят на снабжение Минобороны России

(Приказ МО РФ № 839). Отдельные результаты нашли отражение в отчётах по НИР, проводимых в лаборатории «Методов и приборов иммунного и генетического анализа» ИАП РАН.

Основные публикации соискателя по теме диссертации:

1. **Петров, Д. Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. 1. Влияние температуры / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. А. Корнева, А. С. Альдекеева, Н.Н. Князьков // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – № 2. – С. 91-101.
2. **Петров, Д. Г.** Разработка высокоэффективного метода выделения нуклеиновых кислот, на магнитных частицах / Д. Г. Петров, Н. Н. Князьков, Е. Д. Макарова, С. Н. Малышин, В. Е. Курочкин // Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина». – Москва. – 2015. – Т.1. – С. 99-100.
3. **Petrov, D. G.** Analysis of the effectiveness of the stages of the concentration of genetic material / D. G. Petrov, I. E. Antifeev, N. N. Germash, E. D. Makarova // Journal of Physics : conference series. – 2019. – №033023. – P. 1400.
4. **Петров, Д. Г.** Возможные пути создания автоматического прибора идентификации ПБА методом полимеразной цепной реакции / В. Е. Курочкин, Я.И. Алексеев, Д. Г. Петров, И. Е. Антифеев // Межучрежденческая конференция «Современные аспекты биологической защиты». – Киров. – Т.1. –С. 3-4.
5. **Петров, Д. Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК из модельных растворов на двуокиси кремния. Влияние ультразвука / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, И. Е. Антифеев, А. В. Бродская, Н. Н. Константинова, С.Н. Малышин // Научное приборостроение. – 2017. – Т. 28. – № 4. – С. 40-55.
6. **Петров, Д. Г.** Ультразвуковая суспензионная колонка для анализа *Mycobacterium tuberculosis* с использованием наноструктурированного магнитного сорбента / Р. Х. Дженлода, В. М. Шкинев, Д. Г. Петров, Б. Я. Спиваков // XIII Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Севастополь. – Т.1. – С.43-45.
7. **Petrov, D. G.** DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by PCR detection / R. Kh. Dzhenloda, D. G. Petrov, V. M. Shkinev, B. Ya Spivakov // Mendeleev Communications. – 2017. – №27. – P. 302-303.
8. Flow sample preparation using standing wave ultrasound and magnetic fields in the determination of nucleic acids by real-time polymerase chain reaction [Text] / B. Ya. Spivakov, R. Kh. Dzhenloda, V. M. Shkinev, D. G. Petrov // 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis : Modern Trends and Application. – Heraklion. –№.1. – P.111.
9. **Петров, Д. Г.** Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. Н. Гермаш, И. Е. Антифеев // Научное приборостроение. – 2019. – Т.29. – № 4. – С. 28-50.
10. **Петров, Д. Г.** Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО «Синтол» / В. Е. Курочкин, Я. И.

Алексеев, Д. Г. Петров, А. А. Евстрапов // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – Т. 40. – №3. – С. 69-74.

11. Заявка на изобретение № 2020135259. Автоматизированный прибор для выделения, очистки и анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР-РВ [Текст] / А.А. Евстрапов, Д.Г. Петров, Ю.В. Белов, А.А. Воробьев, А.А. Казанцев, И.Е. Антифеев, Н.А. Есикова, А.Н. Зубик, Н.Н. Гермаш Д.А. Белов; патентообладатель Минобороны России. – № 2020135259; заявл.26.10.2020 опубл.26.04.2022.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа Петрова Д.Г. посвящена развитию приборов и методов автоматизированной пробоподготовки нуклеиновых кислот (НК) к анализу методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В ИАП РАН впервые создана экспериментальная установка, позволяющая создавать и отрабатывать методики автоматического выделения НК из жидких проб.

В работе представлен картридж и методика, позволяющие выделять НК с эффективностью до 100%. Впервые проведены исследования влияния различной температуры и ультразвука различной интенсивности с частотой 2,65 МГц на эффективность выделения НК. Также обоснована актуальность и проведены экспериментальные исследования эффективности выделения НК в проточном режиме под воздействием УЗ. Кроме того, были сформулированы технические и методические рекомендации для создания высокоэффективных приборов и методик для автоматического выделения и очистки НК от примесей.

Указанная выше тематика исследований полностью согласуется с формулой специальности 1.3.2 «Область науки и техники, включающая экспериментальные и теоретические исследования, направленные на разработку новых принципов и методов физических измерений, а также на создание новых приборов и устройств для изучения физических явлений и процессов» области знаний «технические науки».

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 1.3.2 по следующим пунктам:

1. Разработка и создание экспериментальных установок для проведения экспериментальных исследований в различных областях физики.

2. Разработка и создание лечебно-диагностических методик и аппаратных комплексов для биомедицинских исследований.

На основании этого можно заключить, что диссертационная работа соответствует выбранной специальности 1.3.2 «Приборы и методы экспериментальной физики».

По результатам проделанной работы принято решение рекомендовать диссертацию Петрова Дмитрия Григорьевича «Разработка экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе» к защите на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы

экспериментальной физики» в диссертационном совете 24.1.029.01 Института
аналитического приборостроения РАН.

Заключение принято на заседании Научного Семинара ИАП РАН (протокол
№ 8 от 15 сентября 2022 г). Присутствовали: 6 докторов наук,
9 кандидатов наук. Общее число участников – 21. Результаты открытого
голосования: за принятие заключения – 20, против – нет, воздержавшихся – 1.

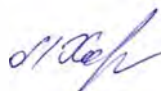
Председатель

Главный научный сотрудник
доктор физико-математических наук



Явор М.И.

Секретарь



Хорошавина Л.П.