

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального исследовательского центра

«Пушкинский научный центр

биологических исследований РАН»

д.ф.-м.н. Грабарник И.Я.

13 февраля 2023г.



### О Т З Ы В

ведущей организации о 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

**Актуальность темы диссертационной работы.** Методы молекулярного анализа нуклеиновых кислот (НК) такие, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в настоящее время очень широко используются как в фундаментальной биологической науке, так и в прикладных исследованиях в медицине, сельском хозяйстве, микробиологии, археологии, в судебной практике и т.д. Подготовка образцов для молекулярно-генетического анализа является важнейшей частью таких методов. Процесс выделения и очистки НК включает в себя несколько стадий: сорбции НК на сорбентах (стекловолоконные мембраны и магнитные сорбенты), удаления загрязняющих компонентов, сушки сорбента от остатков промывочного реагента и переноса НК в раствор для анализа. Многообразие природы и состава анализируемых проб приводит к

необходимости индивидуального подбора условий проведения каждой стадии пробоподготовки. По этой причине разработка автоматизированной программируемой установки, позволяющей экспериментально моделировать, оценивать и изучать каждую из стадий выделения и очистки НК, оценивать их совместимость и регулировать качество и количество выделяемого генетического материала является актуальной задачей современной биофизики и биохимии.

**Научная новизна** диссертационного исследования Д.Г. Петрова определяется тем, что в нем впервые показано влияние изменения длительности отдельных стадий выделения и очистки НК в автоматическом режиме на результат всей пробоподготовки. В работе впервые создана экспериментальная установка, позволяющая проводить выделение НК с использованием ультразвука (частота 2,65 МГц), с эффективностью выделения выше 85% без применения температурного воздействия, а также предложен способ двадцатикратного концентрирования НК в ходе проточного выделения на магнитном сорбенте под воздействием ультразвука.

**Значимость результатов исследования для науки и практики.** Результаты диссертационной работы Д.Г. Петрова имеют существенное значение для развития современных методов исследования в биологии и медицине. Созданная экспериментальная установка позволяет в автоматическом режиме определять и изменять параметры выделения НК на картридже такие, как скорость дозирования, температура, интенсивность ультразвукового воздействия, длительность стадий выделения НК. Это позволяет создавать эффективные методики автоматизированного выделения НК из жидких проб на картриджах с выходом НК более 90%. В работе разработан способ проточного выделения НК с использованием ультразвука из проб объемом 10

мл, который позволяет достичь двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК в элюате по сравнению с непроточным способом выделения НК из такой же пробы.

**Анализ обоснованности и достоверности полученных результатов.**

Работа Д.Г. Петрова выполнена на высоком методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Сформулированные Д.Г. Петровым научные положения и выводы обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам и поставленным задачам исследования.

**Личный вклад автора.** Результаты, включенные в диссертационную работу, получены лично диссертантом Д.Г. Петровым или под его непосредственным руководством. Автор лично планировал, проводил экспериментальные и теоретические исследования, анализировал и обобщал результаты исследований.

**Рекомендации по использованию результатов работы.** Результаты диссертационной работы Д.Г. Петрова могут быть использованы и уже используются в научной и практической работе в исследованиях разнообразных образцов методами ПЦР, а также в лекционных курсах для студентов, обучающихся по направлениям: молекулярная биология, биохимия, биофизика, медицинская физика, научное приборостроение. Материалы диссертации востребованы следующими научно-исследовательскими организациями и производственными фирмами: ИАП РАН (г. Санкт-Петербург), ООО «Синтол» (г. Москва), ГЕОХИ РАН (г. Москва), ФГБУ «48ЦНИИ» МО РФ (г. Сергиев-Посад-6), НИЦ «48 ЦНИИ» МО РФ (г. Киров) и др.

**Апробация работы.** Материалы диссертации опубликованы в трех статьях в журнале «Научное приборостроение». Основные результаты исследования доложены и обсуждены на многочисленных всероссийских и международных конференциях. Результаты экспериментальных исследований, отраженных в диссертации, легли в основу создания методики выделения НК с помощью одноразовых картриджей в Комплексе КВНК, который с 2015 года принят на снабжение Минобороны России (Приказ МО РФ № 839).

**Характеристика работы.** Диссертационная работа изложена на 148 страницах, состоит из Введения, Аналитического обзора работ по выделению НК из различных проб, разделов Экспериментальная установка и картридж для выделения НК, Экспериментальные исследования, Обобщение и внедрение результатов, Заключение и Список использованных источников, включающий 147 источников. Работа содержит 35 рисунков и 12 таблиц.

В обзоре литературы достаточно подробно рассмотрены жидкофазные и твердофазные методы выделения НК; проблемы выбора объекта для выделения НК; лизис проб для выделения НК; сложные пробы для выделения НК; влияние температуры на процесс выделения НК; применение акустического воздействия в ходе выделения НК; выделение, концентрирование и очистка НК из больших объемов растворов макро- и микро-методами. Там же подробно рассмотрены недостатки и преимущества существующих современных автоматизированных систем для выделения НК производства различных фирм. Дана классификация основных серийно выпускаемых приборов для выделения и анализа НК. Сформулированы основные требования к современной системе выделения и очистки НК. Сделано заключение о том, что наиболее востребованной системой в настоящее время является система выделения НК в автоматическом режиме за 30-50 минут, имеющая высокую степень защиты от кросс-контаминации

образцов, обладающая производительностью не менее 4 образцов за цикл с использованием планшетной технологии. Обзор литературы хорошо иллюстрирован рисунками и диаграммами.

Проведенный анализ существующих приборных решений систем выделения НК, позволил диссертанту сформулировать основные задачи диссертационной работы: создание экспериментальной установки для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб; определение режимов ее работы, обеспечивающих высокоэффективное выделение НК; исследование влияния температуры и ультразвука на эффективность выделения НК; разработка эффективного способа проточного концентрирования НК на магнитном сорбенте под воздействием ультразвука; создание протоколов автоматического выделения НК с использованием разработанной установки.

Во второй главе диссертации описан принцип работы и блок схема разработанной экспериментальной установки, а также устройство двух вариантов одноразового картриджа для нее. Описаны эксперименты по выбору материалов для картриджа экспериментальной установки. Эти исследования показали, что наиболее подходящим материалом для изготовления картриджа является фторопласт, поскольку из исследованных материалов он обладает приемлемой сорбционной способностью по отношению к НК, а также обеспечивает требуемые характеристики для узлов трения. В качестве материала для упругого ключа, вставляемого внутрь фторопластового картриджа, был выбран полиуретан. В качестве основного материала для картриджа был выбран Фторпласт-4, полипропилен высокого давления и полиэтилен высокого давления.

В диссертации приведена фотография внешнего вида разработанного макета экспериментальной установки с объяснением назначения его основных частей. Описан алгоритм работы установки. Установка позволяет управлять параметрами стадий выделения НК, а также прерывать процесс

выделения в любой момент и продолжать его с любой стадии. Приведена методика автоматического выделения НК, а также описана работа программного обеспечения экспериментальной установки. Изменяя параметры команд программного обеспечения можно менять скорости дозирования реагентов; режимы перемешивания реагентов; температурные режимы внутри ячейки картриджа; длительность стадий выделения НК.

В третьей главе диссертации описаны экспериментальные исследования, проведенные на разработанном макете экспериментальной установки. В частности, было проведено исследование влияния длительности стадий выделения (сорбция НК, отмывка сорбента, сушка сорбента, элюция НК) на эффективность выделения НК. Определены режимы дозирования и перемешивания реагентов для автоматического выделения НК. Исследовано влияние температуры на эффективность выделения НК. Исследован режим выделения на микроколонке (спин-колонке) и на магнитном сорбенте. Обнаружено, что эффективность сорбции линейно увеличивается с ростом температуры от 20°C до 70°C, а далее практически линейно уменьшается.

Исследовано влияние воздействия мегагерцового ультразвука на пробу во время сорбции на эффективность выделения НК. Проведено теоретическое рассмотрение влияния ультразвука на массообменные процессы в жидкой пробе. Разработан подключаемый ультразвуковой модуль пробоподготовки, позволяющий изменять интенсивность ультразвука в жидкой среде в диапазоне от 0,5 Вт/см<sup>2</sup> до 3,4 Вт/см<sup>2</sup>, в частотном диапазоне излучения от 2,5 до 3,0 МГц. Результаты исследований показали, что для достижения максимальной эффективности выделения ДНК из модельных проб (плазида *m.tuberculosis*), следует воздействовать ультразвуком интенсивности 2,0 - 2,2 Вт/см<sup>2</sup> в течение 10 минут. Такой режим позволяет выделить до 100% целевого продукта.

Диссертантом апробирован способ проточного концентрирования НК с применением ультразвукового воздействия. Для этого была разработана

специальная установка, позволяющая удерживать магнитный сорбент размером 10 -100 мкм (магнитные частицы) в жидкости при интенсивности ультразвука 2,2 Вт/см<sup>2</sup>. Экспериментально определены режимы удержания магнитного сорбента в потоке под воздействием ультразвука для реализации проточного выделения НК. Проведено проточное выделения НК из проб различного объёма (3 мл, 10 мл). Полученные результаты являются основой для разработки перспективных методик концентрирования НК из проб большого объёма.

Текст диссертации хорошо иллюстрирован рисунками, схемами и фотографиями.

Проведённые исследования позволили сформулировать ряд технических требований для создания серийного прибора для высокоэффективного выделения НК из жидких проб с помощью одноразовых картриджей.

Особенно ценно то, что результаты работы, изложенные в диссертации, были использованы для разработки Комплекса выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК), который был создан в соответствии с техническим заданием заказчика из ИАП РАН. Комплекс КВНК предназначен для автоматического выделения ДНК/РНК возбудителей инфекционных заболеваний из жидких проб. Он способен обрабатывать одновременно до 4 образцов (объем жидкого образца 2 мл). Выделение НК происходит за время не более 1 часа. Объем очищенного препарата может быть от 50 до 500 мкл.

Диссертантом сформулированы три положения, выносимые на защиту, и пять выводов. Все они достаточно хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

**Замечания и вопросы.** Принципиальных замечаний по выполненному диссертационному исследованию нет. Отмечу, однако, что схема установки для проточного концентрирования нуклеиновых кислот в части вариантов применения для мониторинга объектов окружающей среды

требует дополнительного пояснения. Хотелось бы знать какие варианты внешнего облика установки могут быть предложены автором. Кроме того, стоило бы дать в диссертации подробное описание способов подведения ультразвука к рабочей ячейке картриджа, а также обсуждение того, какие при этом существуют ограничения и какие способы их преодоления может предложить автор.

Отмечу, что, несмотря на то, что диссертация написана понятным научным языком, в ней встречаются многочисленные пунктуационные ошибки.

**Заключение.** Таким образом, диссертационная работа Д.Г. Петрова является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора технических наук, профессора Курочкина Владимира Ефимовича, содержащей новое решение актуальной научной задачи – создание основ для разработки нового поколения серийно выпускаемых приборов для анализа нуклеиновых кислот.

Тематика диссертационного исследования полностью 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.

Диссертация полностью удовлетворяет требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 в действующей редакции), предъявляемым ВАК к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор, Петров Дмитрий Григорьевич, несомненно,



заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – приборы и методы экспериментальной физики.

Отзыв был обсужден на семинаре Лаборатории новых методов в биологии Института биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» 10 февраля 2023 года, протокол № 1.

Главный научный сотрудник Института биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», д.б.н., профессор

Е.А. Пермяков

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»; 142290 Московская область, г. Пушкино, Проспект науки, 3. Телефон +7 (4967) 73-26-36; Эл. почта [ibr.ran@yandex.ru](mailto:ibr.ran@yandex.ru)

Подпись Пермякова Е.А.  
удостоверяется  
Наз. отг. кадр.



Т.Н. Семенов