

ОТЗЫВ

официального оппонента диссертационной работы

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

Диссертационная работа Петрова Дмитрия Григорьевича посвящена разработке экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на основе метода твердофазной экстракции.

Актуальность темы не вызывает сомнений, поскольку работа направлена на решение важной проблемы обнаружения и определения вирусов и бактерий в клинических образцах, пищевых продуктах, образцах окружающей среды, а также при проведении археологических и судебных исследований. Молекулярные методы анализа нуклеиновых кислот (НК), такие как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), являются самыми распространенными способами обнаружения и количественного определения вирусов и бактерий в исследуемых образцах. Многолетняя практика применения методов ПЦР при анализе различных проб подтверждает определяющую роль подготовки образцов перед молекулярно-генетическим анализом.

В настоящее время для выделения НК широкое распространение получили методы твердофазной экстракции с использованием стекловолоконных мембран и магнитных сорбентов. Процесс выделения НК состоит из нескольких стадий: сорбции, промывки (для удаления компонентов, мешающих ПЦР), сушки сорбента от остатков промывочного реагента и элюирования НК для дальнейшего анализа. От эффективности каждой стадии зависят эффективность всей процедуры пробоподготовки и, соответственно, результаты анализа.

Многообразие природы и состава анализируемых проб, содержащих разные виды и количества примесей, обуславливает необходимость подбора условий проведения каждой стадии пробоподготовки. Таким образом, разработка автоматизированной программируемой установки, позволяющей экспериментально моделировать и изучать каждую из стадий выделения НК, оценивать их совместимость и соответствие требованиям к качеству и количеству выделяемого генетического материала является чрезвычайно актуальной. 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 определенного 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.

Научная новизна работы сформулирована следующим образом:

1. Впервые показано влияние длительности отдельных стадий выделения НК в автоматическом режиме на результат всей пробоподготовки.

2. Впервые создана экспериментальная установка, позволяющая проводить выделение НК под воздействием ультразвука (УЗ, с частотой 2,65 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.

Несомненна **практическая значимость** работы. Полученные Петровым Д.Г. результаты открывают новые возможности при проведении молекулярно-генетического анализа образцов различной природы и состава. Созданная установка позволяет определять и изменять параметры выделения НК на картридже в автоматическом режиме, что позволяет создавать новые или увеличивать эффективность действующих методик автоматизированного выделения НК из жидких проб на картриджах. Показано, что управление параметрами выделения НК из модельных проб позволяет спрогнозировать результативность выделения и достичь более, чем 90% выход ДНК. Также показан способ проточного выделения НК под воздействием УЗ, который позволяет достичь двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК в элюате. 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.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка использованных источников. Работа содержит 148 страниц машинописного текста, 12 таблиц и 35 рисунков. Список использованных источников включает 147 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследований, защищаемые положения, отражены структура, объем и содержание диссертации.

Первая глава диссертации посвящена аналитическому обзору работ по различным способам и методиками выделения НК, в том числе с применением коммерческих автоматизированных приборов и систем. Сформулирована цель работы и решаемые задачи.

Во второй главе сформулированы основные требования к создаваемой установке и изложен путь реализации этих требований, включая

экспериментальную оценку материалов картриджа для выделения нуклеиновых кислот.

В третьей главе приведены результаты экспериментальных исследований по определению количества жидких реагентов и условий для их качественного перемешивания, времени инкубирования на различных стадиях выделения, обеспечивающие выделение НК в автоматическом режиме.

В четвертой главе представлен Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК), обеспечивающий выделение НК из жидких проб (до 4 образцов) с помощью одноразовых картриджей, содержащих необходимые реагенты.

Диссертация Петрова Д.Г. прошла хорошую **апробацию**: результаты доложены и обсуждены на представительных международных и российских конференциях. Результаты экспериментальных исследований легли в основу создания методики выделения НК с помощью одноразовых картриджей в Комплексе КВНК.

Степень достоверности полученных результатов подтверждается публикациями в рецензируемых журналах перечня ВАК и Scopus/Web of science. Основное содержание диссертации опубликовано в 10 работах. Из них 6 статей ВАК и 3 статьи, индексируемые в базе данных Scopus/Web of science.

Используемые в работе экспериментальные и теоретические методы, современное оборудование, а также обсуждение полученных данных свидетельствуют о их достоверности.

Поставленная цель и задачи выполнены, выводы работы полностью обоснованы, автореферат и публикации отражают содержание диссертации и подтверждают значимость личного вклада соискателя в полученные результаты.

Автореферат полностью отражает цели, задачи, основные положения диссертации, полностью соответствует по содержанию и выводам.

Вопросы и замечания:

- 1) Хотелось бы увидеть более четкое описание механизма взаимодействия НК с оксидом кремния. Непонятно, что подразумевается под «экранированными межмолекулярными электростатическими взаимодействиями»? Может ли дегидратироваться поверхность оксида кремния, в котором по определению нет воды? Кроме того, приводит ли образование водородных связей к дегидратации молекул?
- 2) Данные, приведенные в таблице 2.1, показывают, что потери НК, связанные с их сорбцией на стенках картриджа, увеличиваются при снижении концентрации НК. Чем это можно объяснить? Предполагается ли работа с более низкими концентрациями НК в пробах и не будут ли в данном случае потери НК на стенках картриджа еще больше?

- 3) В описании используемых материалов не приведены характеристики используемых магнитных частиц, например, их размерное распределение. Являются ли они коммерчески доступными или синтезированы автором работы?
- 4) Как следует из описания стадии отмывки сорбента от остатков лизата, промывочный раствор после каждой стадии перекачивается обратно в исходную ячейку. Можно ли использовать дополнительную ячейку для слива отработанного промывочного раствора, что могло бы увеличить эффективность отмывки?
- 5) В разделе «Определение режимов дозирования и перемешивания реагентов для автоматического выделения НК» приведены скорости дозирования в двух размерностях мл/с и мл/мин. Какая размерность является верной? Может ли быть связано варьирование скорости дозирования реагентов (от 1.5 до 3.0 мл/с) не только с параметрами картриджа (диаметром каналов и типом материала), но и также с характеристиками реагентов, например, их плотности и вязкости?
- 6) С чем по мнению автора связано снижение выхода НК при увеличении температуры выше 70°C? Почему для сорбции ДНК под воздействием УЗ была выбрана частота именно 2.65 МГц; использовали ли УЗ других частот?
- 7) В работе указывается, что эксперименты проводились в трех повторах, однако в таблицах отсутствуют данные, характеризующие разброс результатов, что важно при оценке полученных результатов. Также не хватает единообразия в использовании некоторых терминов, например, силикатная мембрана/стекловолоконная мембрана или элюция/элюирование. Кроме того, в работе присутствуют опечатки, а также грамматические и пунктуационные ошибки.

В целом, отмеченные замечания носят частный или рекомендательный характер, не затрагивают существа выносимых на защиту положений и не могут изменить общей положительной оценки работы.

Считаю, что диссертационная работа Петрова Д.Г. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой разработана экспериментальная установка для автоматизированного выделения НК из образцов различной природы. Работа прошла апробацию, имеет важное теоретическое и практическое значение при проектировании (модернизации) автоматизированных систем пробоподготовки и анализа НК.

По объёму проведенных исследований, актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, уровню их достоверности диссертационная работа Петрова Д.Г. соответствует паспорту специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Диссертация «Разработка экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе» отвечает требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции от 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Петров Дмитрий Григорьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики.

Кандидат химических наук (02.00.02 – аналитическая химия), старший научный сотрудник лаборатории геохимии наночастиц Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН; 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 19; ermolin@geokhi.ru; +7(963)675-19-72.

Я, Ермолин Михаил Сергеевич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

«16» февраля 2023 г.

Ермолин Михаил Сергеевич

Подпись
УАФ

Михаил Сергеевич Ермолин