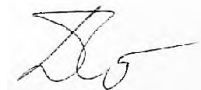


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (ИАП РАН)

На правах рукописи



Петров Дмитрий Григорьевич

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ
МЕТОДИК АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ

Специальность:

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени

Кандидата технических наук

Санкт-Петербург 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской Академии Наук, в лаборатории Методов и приборов генетического и иммунного анализа.

Научный руководитель: **Курочкин Владимир Ефимович**
Доктор технических наук, профессор, Руководитель научного направления «Методы и приборы генетического анализа» Института аналитического приборостроения Российской Академии наук

Официальные оппоненты: **Чернышов Андрей Владимирович**
Доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Вакуумная техника и компрессорная техника» Московского Государственного Технического Университета им. Н.Э. Баумана
Ермолин Михаил Сергеевич
Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории концентрирования Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской Академии наук

Ведущая организация: Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН

Защита состоится: Защита состоится 10 марта 2023 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения (ИАП РАН) по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться: С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, г. Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26, ИАП РАН, а/я 207.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

Актуальность темы

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 очищенных НК, необходимое для получения достоверного результата анализа).

Многообразие природы и состава 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 рекомбинантной плазмиды pIS6110 *M.tuberculosis* (ООО «Синтол», Москва), объект 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 ультразвука (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 объёма (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.

Цель работы:

Разработка установки для создания и модификации методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе.

Указанная цель достигается путём решения следующих задач:

1. Создание экспериментальной установки для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб.

2. Анализ и определение режимов работы установки (скорости дозирования и параметров перемешивания реагентов, длительности взаимодействия реагентов), обеспечивающих эффективное выделение НК.

3. Исследование влияния температуры и воздействия ультразвука на эффективность выделения НК.

4. Оценка эффективности способа проточного концентрирования НК под воздействием УЗ на магнитном сорбенте с определением условий удержания сорбента в потоке, обеспечивающих повышение степени концентрирования в сравнении с не проточным способом выделения.

5. Создание протоколов автоматического выделения НК с использованием разработанной установки и оценка их работоспособности в серийно выпускаемом приборе для выделения нуклеиновых кислот.

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 2,65 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.

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 2,65 МГц;
- длительность различных стадий выделения НК.

Это позволяет создавать новые 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эффективность выделения плазмиды из модельной пробы на магнитном сорбенте достигает 75% при длительности сорбции в течение 1 минуты и нагревании пробы до 70°C. При дальнейшем повышении температуры эффективность выделения снижается.

2. Ультразвуковое воздействие с частотой 2,65 МГц во время сорбции в диапазоне интенсивностей от 1,8 до 2,2 Вт/см² в течение 1-5 минут обеспечивает эффективность выделения НК из модельного образца с средним 80%.

3. Выделение НК из модельной пробы проточным способом под воздействием УЗ из пробы объёмом 10 мл, со скоростью пропускания 1 мл/мин через магнитные частицы размером от 10 до 100 мкм, удерживаемые УЗ с частотой 2,65 МГц и интенсивностью 2,0 Вт/см², двадцатикратно повышает концентрацию НК в элюате, по сравнению со стационарным режимом выделения.

Апробация работы

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 межучрежденческих конференциях, проводимых Минобороны России.

Результаты экспериментальных исследований легли в основу создания методики выделения НК с помощью одноразовых картриджей в Комплексе КВНК, востребованном 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.

Методы исследования и оценка достоверности результатов

В работе использованы следующие методы исследования и анализа:

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, метод электрофоретического анализа НК, методы статистической обработки экспериментальных данных. Основными научными методами, используемыми в диссертации, являются общенаучные (сравнение, анализ, синтез, индукция, дедукция, экспериментальные исследования).

Степень достоверности подтверждается публикациями в рецензируемых журналах перечня ВАК и Scopus, а также применением поверенных средств измерения: объёмов жидкости, времени, температуры, концентрации НК.

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 работах. Из них 6 статей ВАК и 3 статьи индексируемые в базе данных Scopus и Web of science.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх 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, объём 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.

Отмечено, что наиболее распространёнными пробами для выделения НК являются клинические образцы, а наиболее сложными представляются пробы окружающей среды, так как они могут содержать широкое разнообразие видов примесей.

Эффективность методики выделения НК на твердофазных сорбентах определяется характеристиками процессов сорбции-десорбции, прямо зависящих от интенсивности массообменных процессов. В работе представлен анализ литературных данных по изучению способов интенсификации таких процессов при выделении биологических молекул, включая НК. Также представлены результаты литературного обзора по приборам и методам выделения НК из проб большого объема.

В заключительной части литературного обзора представлены наиболее распространённые серийно выпускаемые автоматизированные приборы для выделения нуклеиновых кислот, представлены фотографии, схемы и краткое описание приборов, а также их основные недостатки и преимущества перед другими приборами.

Сформулирована цель работы и решаемые задачи.

Во второй главе сформулированы основные требования к созданной установке и изложен путь реализации этих требований, включая экспериментальную оценку материалов картриджа для выделения нуклеиновых кислот. В разделе 2.1 приведен принцип построения экспериментальной установки, представленный в виде блок-схемы функциональных модулей. Блок схема экспериментальной установки, представлена на рисунке 1.

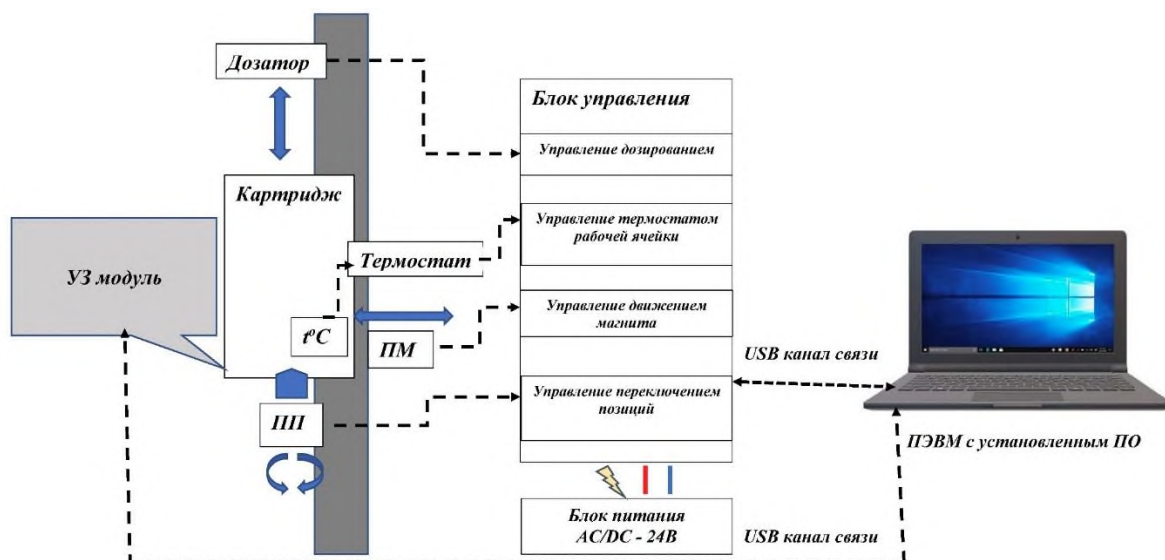


Рисунок 1 – Блок-схема экспериментальной установки, где *Дозатор* – привод обеспечивающий перемещение поршня картриджа с точностью 0,01 мм, *ПП* – привод переключателя обеспечивает вращение крана переключателя с точностью 0,9°, *ПМ*–привод магнита обеспечивает перемещение магнита к картриджу и от него с точностью 0,01 мм; t°C – датчик температуры, УЗ модуль – подключаемый модуль содержащий ячейку для сорбции НК при выделении в стационарном и проточном режимах

Функционирование установки осуществляется согласно заданной последовательности команд, сформированных в рабочий протокол, передаваемый с ПЭВМ. Командами задают значения параметров движения шаговых двигателей, за счёт чего происходит: дозирование и перемещение реагентов между ячейками; переключение позиций, каждая из которых соответствует своей ячейке; перемещение магнита к рабочей ячейке и от неё. Нагрев и поддержание температуры рабочей ячейки осуществляется с помощью термостата, параметры работы которого также заданы в протоколе. В разделе 2.2 обоснован выбор материалов для картриджа экспериментальной установки.

В разделе 2.3 изложен принцип работы созданной установки, перечень команд и алгоритм взаимодействия оператора с экспериментальной установкой с помощью созданного ПО. Таким образом, обработка пробы в соответствии с заданным протоколом работы установки позволяет в автоматическом режиме выделять НК. На рисунке 2 представлена схема реализации обобщённой методики выделения НК (обобщённый протокол работы) на картридже. Стрелками обозначены движения реагентов из соответствующих пронумерованных ячеек, через центральную ячейку-посредник в которой перемещается поршень, обеспечивающий расход жидкости с заданной скоростью.

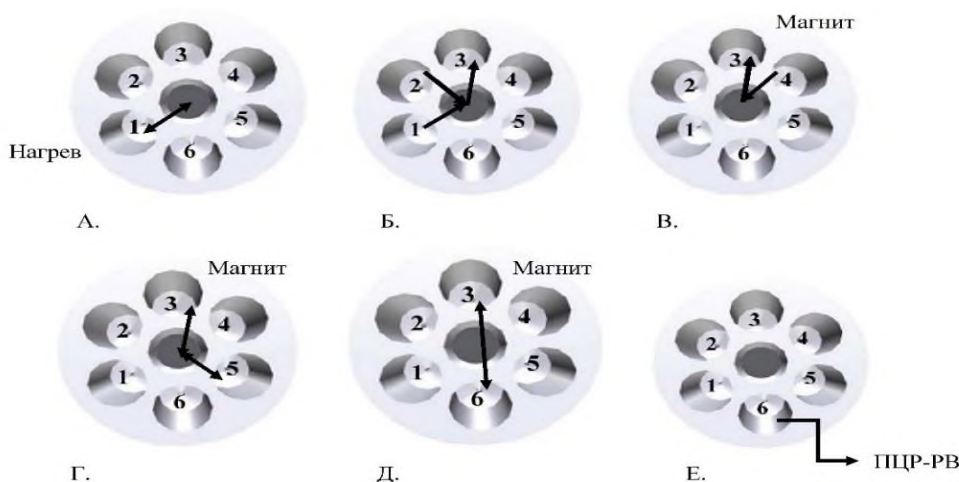


Рисунок 2 – Схема реализации обобщённой методики выделения НК на картридже в общем виде, где А - лизис пробы, нагрев до 70°C в течение 15 мин, ячейка 1, Б – смешивание пробы с магнитным сорбентом из ячейки 2, сорбция НК, перемещение в ячейку 3, В - отмывка сорбента от лизата раствором из ячейки 4, Г - сушка сорбента от остатков промывочных растворов прокачкой воздуха из ячейки 5 и обратно, Д - добавление к сорбенту элюирующего реагента из ячейки 6, нагрев до 60°C в течение 10 мин, Е - забор элюата НК на ПЦР-РВ механическим дозатором из ячейки 6

В третьей главе приведены результаты экспериментальных исследований по определению количества жидких реагентов и условий для их качественного перемешивания, времени инкубирования на различных стадиях выделения (раздел 3.1), обеспечивающие выделение НК в автоматическом режиме.

В разделе 3.2 представлены результаты исследований по определению зависимости эффективности выделения НК из модельных проб от температуры в диапазоне от 20°C до 90°C на стадии сорбции. В разделе 3.3 представлены результаты зависимости эффективности выделения НК из модельных проб от УЗ воздействия, с частотой 2,65 МГц в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см².

На рисунке 3 представлены средние значения (n=10) зависимости эффективности выделения НК из модельных проб от температуры на стадии сорбции в течение 1 минуты на стекловолоконной мембране и магнитном сорбенте.

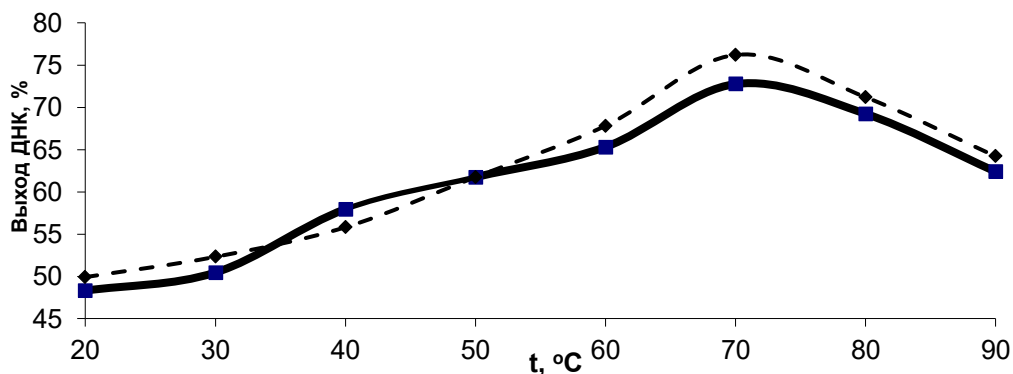


Рисунок 3 – Зависимость эффективности выделения НК от температуры во время стадии сорбции в течение 1 минуты. — — — выход НК на магнитных частицах, - - - - выход НК на спин-колонке (стекловолоконной мембране)

Экспериментальные данные свидетельствуют о малом отличии (в пределах погрешности) этих зависимостей. Максимум эффективности выделения НК, достигает $\sim 75\%$ при температуре 70°C . При более длительной стадии сорбции результат выделения превышает 90% , а зависимость сохраняет свою форму.

На рисунке 4 представлена схема УЗ модуля для исследований эффективности выделения НК на магнитном сорбенте и стекловолоконной мембране от УЗ воздействия на стадии сорбции.

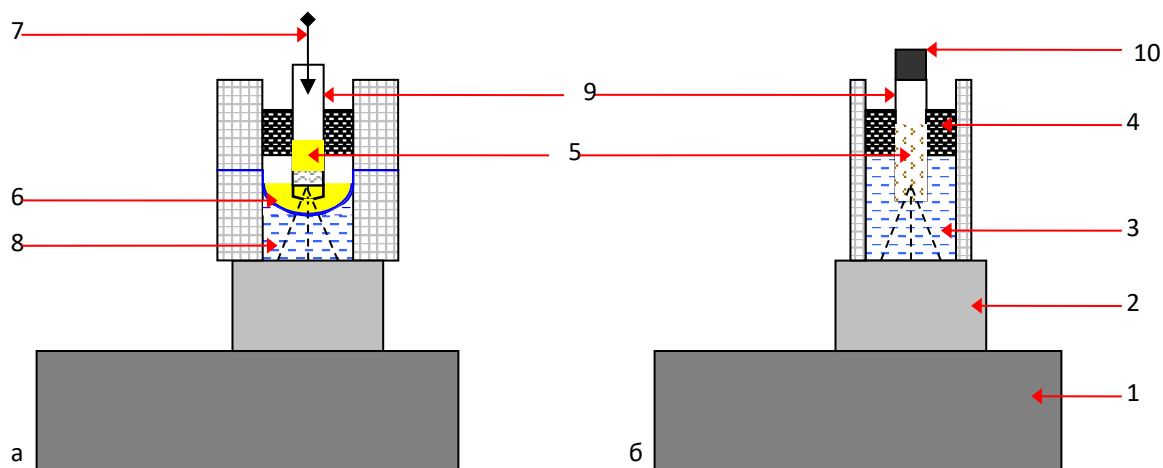


Рисунок 4 – Схемы УЗ модуля пробоподготовки со стекловолоконном (а) и с магнитными частицами (б), где 1 – блок управления УЗ излучением, 2 – УЗ излучатель, 3 – дистиллированная вода, 4 – материал для фиксации колонки с силикатной мембраной (а), кюветы с магнитным сорбентом (б), 5 – проба объемом 1 мл, 6 – кювета для сбора пробы после пропускания через стекловолоконную мембрану, 7 – устройство подачи пробы (шприцевой дозатор), 8 – УЗ излучение, 9 – колонка со стекловолоконной мембраной (а), кювета (б), 10 – пробка

Принцип работы модуля состоит в воздействии УЗ на частоте $2,65 \text{ МГц}$ с заданными оператором значениями интенсивности на пробу при пропускании через стекловолоконную мембрану (а) или кювету с магнитным сорбентом (б) во время стадии сорбции. После окончания стадии сорбции и выключения УЗ проба забирается механическим дозатором: – в случае со стекловолоконной мембраной из кюветы б; – в случае с магнитным сорбентом из кюветы 5. Собранная проба помещается в ячейку 3 картриджа созданной установки, далее включается на исполнение протокол автоматического выделения НК без стадии сорбции.

На рисунке 5 представлены усредненные по 10 экспериментам значения эффективности выделения НК от УЗ воздействия в течение 1 минуты на магнитном сорбенте (частицах) и стекловолоконной мембране.

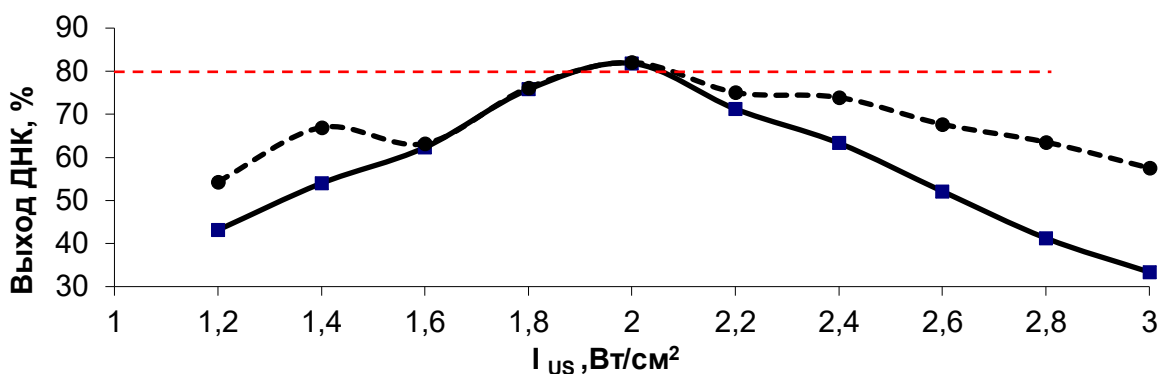


Рисунок 5 – Зависимость эффективности выделения НК на стекловолоконной мембране и магнитном сорбенте от интенсивности УЗ на стадии сорбции в течение 1 минуты.
 — - выход ДНК на магнитных частицах , - - - выход ДНК на стекловолоконной мембране

Представленные данные говорят о близких свойствах магнитных частиц и стекловолоконных мембран по сорбции НК вблизи значений УЗ воздействия обеспечивающих максимум концентрирования. Из графиков также видно, что при УЗ воздействии на частоте 2,65 МГц и интенсивностями 1,8-2,0 Вт/см², в течение 1 минуты удаётся достичь в среднем 80% эффективности выделения НК.

На рисунке 6 представлены усредненные по 10 экспериментам значения эффективности выделения НК из проб в зависимости от УЗ воздействия с частотой 2,65 МГц, в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см², на стадии сорбции в течение 1, 5 и 10 минут.

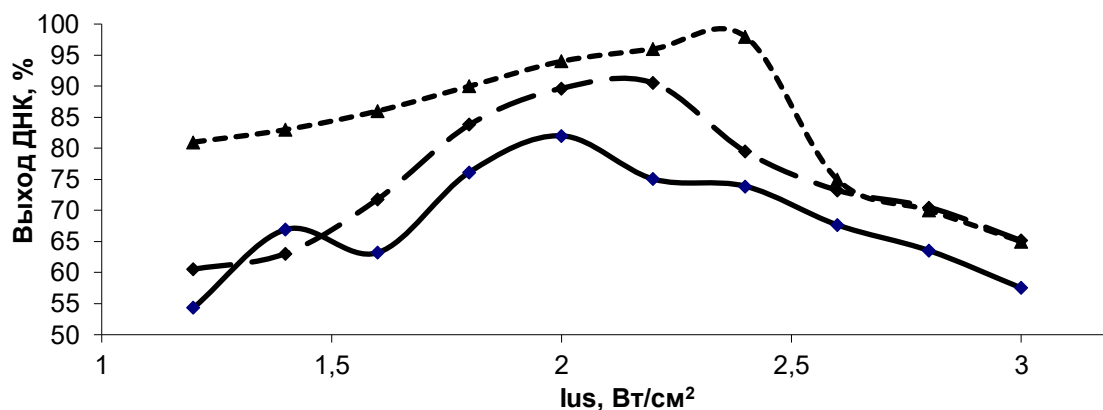


Рисунок 6 – Зависимость средних значений выхода НК из модельных проб при УЗ воздействии на стадии сорбции на магнитных частицах в течение различного времени:
 1 мин – — , 5 мин – - - , 10 мин – - - -

Представленные данные свидетельствуют о том, что эффективность выделения НК из модельных проб под воздействием УЗ с частотой 2,65 МГц в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см² зависит от времени, а 90% выход НК удаётся достичь при 5 минутном воздействии при интенсивности 2,2 Вт/см².

Для проверки сохранности структуры ДНК в модельной пробе под воздействием УЗ. Пробу объёмом 1 мл в течение 1, 5 и 10 минут подвергали воздействию ультразвука

с частотой 2,65 МГц с заданной интенсивностью, после чего отправляли раствор на электрофоретический анализ. На рисунке 7 представлен результат эксперимента.

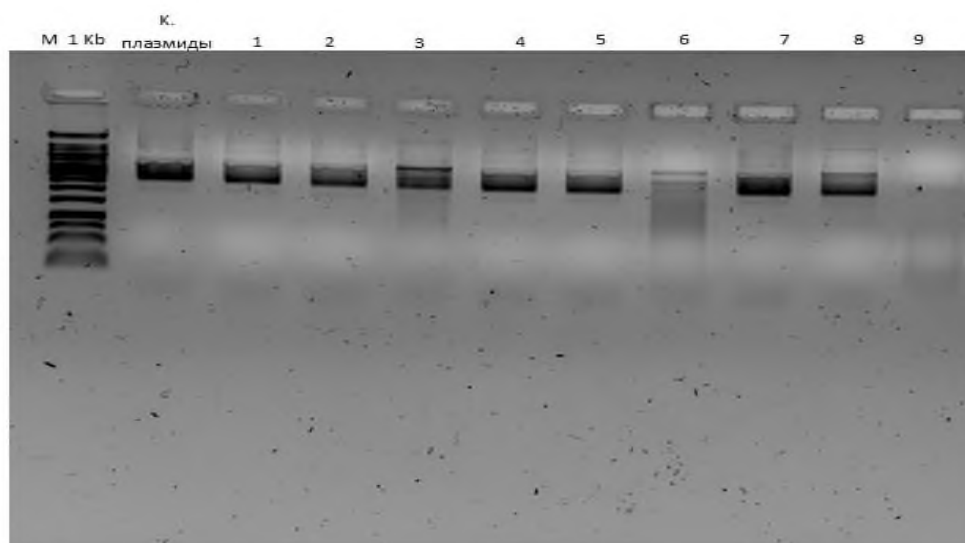


Рисунок 7 – Результаты электрофоретического анализа плазмиды после УЗ воздействия. 1– интенсивность 1,2 Вт/см² 1 мин, 2 – интенсивность 2,0 Вт/см² 1 мин, 3 – интенсивность 3,0 Вт/см² 1 мин, 4 – интенсивность 1,2 Вт/см² 5 мин, 5 – интенсивность 2,0 Вт/см² 5 мин, 6 – интенсивность 3,0 Вт/см² 5 мин, 7– интенсивность 1,2 Вт/см² 10 мин, 8 – интенсивность 2,0 Вт/см² 10 мин, 9 – интенсивность 3,0 Вт/см² 10 мин. В качестве маркера использовали нуклеотидный референс Gene Ruller 1 kb (Fermantas)

Из представленных результатов можно сделать вывод о том, что ДНК в форме плазмиды фрагментируется при длительном УЗ воздействии на частоте 2,65 МГц и интенсивности 3,0 Вт/см², частично этот процесс уже начинается при 5 минутном воздействии (дорожка 6) и более выражен при 10-ти минутном воздействии той же интенсивности (дорожка 9). Напротив, даже при 10 минутном воздействии при интенсивностях 2,0 Вт/см² и менее, ДНК в форме плазмиды сохраняет свою структуру (дорожка 8).

В разделе 3.4 представлены результаты экспериментальной работы по апробации проточного концентрирования НК под воздействием УЗ из различных проб, включая описание соответствующей установки, принципиальная схема которой представлена на рисунке 8. Для концентрирования НК в потоке была создана проточная стеклянная камера с рабочим объёмом 1,5 мл. Данная камера закреплялась над УЗ излучателем так, чтобы фокус излучения попадал в центр проточной камеры. Удержание магнитного сорбента (магнитных частиц размером 10-100 мкм) при пропускании через него пробы осуществлялось с помощью УЗ воздействия с частотой 2,65 МГц, и интенсивностью 2,0 Вт/см². При расходе 1,0 мл/мин обеспечивалось удержание сорбента соответствующее количеству при выделении на картридже разработанной установки или при ручном выделении НК. Скорость пропускания пробы задавали перистальтическим насосом, при необходимости циклического пропускания, замыкали контур подачи пробы (вход-выход). При отключении УЗ и

закреплении магнита на выходе из проточной камеры обеспечивалось удержание сорбента при пропускании промывочных растворов, сушки сорбента и элюции.

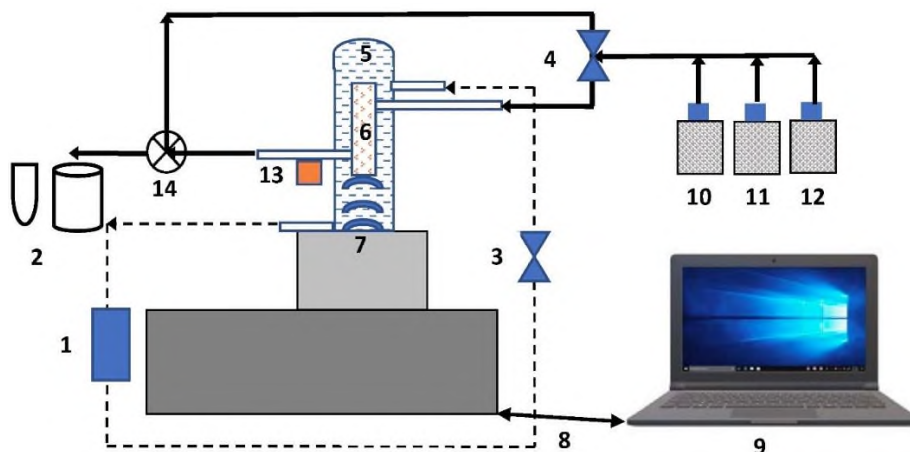


Рисунок 8 – Принципиальная схема установки для проточного концентрирования НК.

1 – емкость с дистиллированной водой, 2 – емкости для слива или очищенной НК, 3,4 – перистальтические насосы, 5 – внешний охлаждающий объем, 6 – реакционная камера, 7 – излучатель УЗ, 8 – канал связи, 9 – ПЭВМ, 10 – проба; 11 – промывной реагент, 12 – элюирующий реагент, 13 – постоянный магнит, 14 – кран переключения потоков

На созданной установке показана возможность концентрирования НК из различных проб объемом 3 и 10 мл. Экспериментально показано, что способ проточного выделения НК при трёхкратном пропускании модельной пробы через удерживаемый под воздействием УЗ сорбент, способен обеспечить двадцатикратное повышение концентрации НК в элюате в сравнении выделением НК из такой же пробы в стационарном режиме.

В заключении к главе 3 сформулированы методические рекомендации по созданию высокоэффективных методик автоматизированного выделения НК из жидких проб с помощью картриджей и проточного концентрирования.

В четвёртой главе представлен Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК). На рисунке 9 представлена фотография основного модуля этого комплекса – блока для выделения нуклеиновых кислот (Блок БВНК).



Рисунок 9 – Блок БВНК из состава Комплекса КВНК

Созданный Комплекс КВНК обеспечивает выделение НК из жидких проб с помощью одноразовых картриджей, содержащих необходимые реагенты. Комплекс способен одновременно обеспечить обработку 4 образцов. В результате выделения очищенный препарат содержащий НК можно анализировать молекулярными методами, такими как ПЦР-РВ.

Созданная установка позволила разработать методику функционирования Комплекса для воспроизводимого автоматизированного выделения НК из таких проб как проточная вода, слюна, плазма, смывы почв.

В заключении представлены результаты, главным из которых является разработанная экспериментальная установка для создания и модификации методик автоматизированного выделения НК твердофазными методами. Внешний вид установки приведен на рисунке 10.

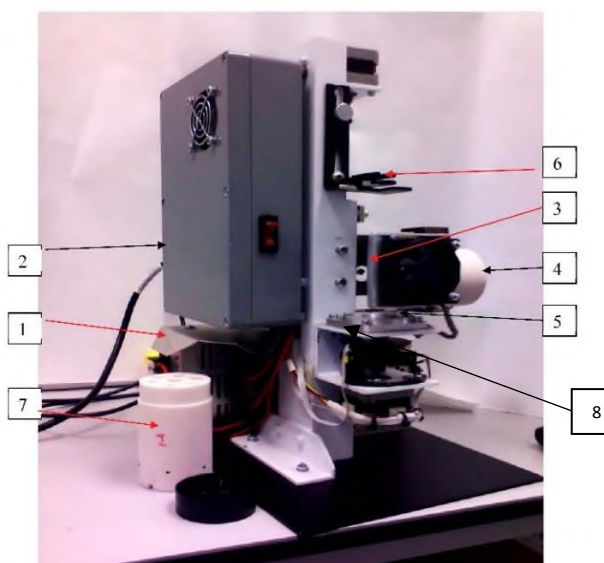


Рисунок 10 – Экспериментальная установка. 1– блок питания, 2 – блок электронных схем, 3 – магнит, 4 – термостат, 5 – кран-переключатель, 6 – фиксатор поршня, 7 – картридж для реагентов и пробы, 8 – место установки картриджа

Созданная установка в совокупности с ПО и картриджем для выделения НК позволяет разрабатывать новые и модифицировать действующие методики автоматизированного выделения НК из жидких образцов объёмом до 5 мл (объём ячейки созданного картриджа). Создание новой методики пробоподготовки реализуется путём оптимизации параметров, а именно: длительности стадий выделения НК; количества промывок сорбента; скоростей дозирования (расхода) реагентов внутри картриджа; температуры и УЗ воздействия. Это позволяет создавать новые высокоэффективные методики автоматизированного выделения НК на магнитном сорбенте или стекловолоконной мембране.

Результаты и выводы:

1. Разработана экспериментальная установка, позволяющая создавать и апробировать методики выделения нуклеиновых кислот твердофазными методами. Определение параметров отдельных стадий автоматизированного выделения НК,

обеспечивающих повышение эффективности всей процедуры в целом, позволяет создавать новые и модифицировать действующие протоколы выделения НК с целью повышения эффективности пробоподготовки.

2. Определены режимы работы созданной установки, обеспечивающие высокоэффективное выделение НК. Полученные экспериментальным путём параметры: скорости потока реагентов, режимы перемешивания реагентов, время перемешивания реагентов, позволяют прогнозировать эффективность вновь создаваемой методики автоматизированного выделения НК.

3. Экспериментально исследовано влияние тепловых воздействий в диапазоне от 20°C до 90°C и УЗ воздействий с частотой 2,65 МГц в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см² на эффективность выделения НК из жидких проб. Определены условия, при которых достигается максимум, а также условия, при которых происходит снижение эффективности выделения. Полученные данные позволяют экспериментально определять параметры УЗ и теплового воздействий, обеспечивающие максимальную эффективность выделения НК.

4. Показана возможность выделения НК проточным способом под воздействием УЗ из модельных проб объёмом 10 мл и концентрацией менее 1000 молекул/мл. С помощью трёхкратного (и более) количества пропусков пробы через удерживаемый в потоке сорбент удаётся двадцатикратно повысить степень концентрирования НК в элюате в сравнении со стационарным режимом выделения. Такой способ выделения НК востребован при необходимости анализа проб большого объёма при санитарно-эпидемиологическом мониторинге таких объектов как: проточная вода, природные водоёмы, водохранилища и др.

5. Серийно выпускаемый Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК) позволяет выделять НК из жидких проб в автоматическом режиме. Созданные с использованием разработанной установки методики выделения НК для Комплекса КВНК подтверждают адекватность предложенного подхода к разработке, отладке и модификации методик для автоматического выделения НК.

Материалы, опубликованные автором по результатам работы

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 печатных работах и одной заявке на изобретение. Из них 7 статей перечня ВАК, 3 публикации индексируемые в базе данных Scopus и Web of science.

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.

Мальшин, 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. Мальшин // 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. Евстапов // 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. Евстапов, 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.