

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Тупик Александры Николаевны
*«Разработка микрочиповых устройств для проведения полимеразной цепной
реакции в гелевой среде»*, представленную на соискание ученой степени
кандидата технических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы
экспериментальной физики»

Диссертация ориентирована на разработку миниатюрных устройств (“микрочипов”) для осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью метода молекулярных колоний в геле. Тема диссертационного исследования **актуальна** и представляет значительный интерес для науки и практики из-за возможности применения микрочиповых технологий не только для лабораторных исследований, но и для проведения высокочувствительной медицинской диагностики, а также проведения мониторинга состояния окружающей среды, анализа качества продуктов питания в пищевой промышленности, проведения тестов в криминалистике и других областях.

Практическая значимость работы заключается в оригинальности как разработанной конструкции, так и предложенной технологии изготовления “микрочиповых” устройств, способных значительно улучшить чувствительность диагностики. Разрабатываемые в диссертационной работе методы и подходы направлены на минимизацию трудоемкости и снижение продолжительности анализа при проведении ПЦР в гелевой среде. Результаты проведенной работы способны расширить границы использования разрабатываемого метода от его единичных применений в исследовательских лабораториях до практического приложения к работе диагностических центров. Использование результатов работы, связанных с определением влияния твердофазных полимерных материалов и композиций

на эффективность ПЦР при выполнении НИОКР: «Создание роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований» подтверждается Актом внедрения от 05.10.2015 года.

Оценивая **степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**, следует отметить следующее. В диссертационной работе достаточно корректно применяются современные методы исследования (оптическая ближнепольная и конфокальная микроскопия, спектрофотометрия, сканирующая зондовая микроскопия) и используются хорошо апробированные статистические методы анализа полученных результатов для обоснования выводов и научных положений. Автором диссертации проанализированы и изучены достижения и результаты других исследователей по вопросам проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде. Проведенные экспериментальные исследования показали хорошее соответствие результатов, полученных автором в гелевой среде, с результатами, полученными методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на сертифицированном оборудовании (прибор для ПЦР-РВ АНК-32). Аналогичные экспериментальные результаты были получены в работах зарубежных исследователей при проведении реакции с фиксацией одного из реагентов в гелевой среде методом полимеразных колоний – “полоний”. Поэтому достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе не вызывает сомнений. Они корректно сформулированы, внутренне непротиворечивы, убедительны и логически следуют из содержания глав диссертационной работы, которое рассмотрено ниже. Поэтому можно сделать вывод о том, что обоснованность научных положений и выводов диссертационной работы, а также их новизна подтверждается большим количеством экспериментальных данных, их отличной воспроизводимостью и корректностью обработки, глубиной анализа результатов эксперимента, а также соответствием результатов

работы результатам экспериментальных исследований, полученных другими методами.

Апробация работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 13 печатных работах, девять из которых опубликованы в ведущих научных журналах, внесенных в Перечень ВАК РФ. Результаты работы неоднократно обсуждались на многочисленных конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

Личный вклад соискателя. Положения и выводы диссертации являются результатом самостоятельного исследования автора диссертационной работы, Тупик Александры Николаевны, которая принимала активное участие в формулировании цели и задач исследования и планировании экспериментов, самостоятельно проводила многочисленные эксперименты и обрабатывала их результаты. Можно отметить значительный вклад автора в написании научных статей по тематике диссертационной работы.

Общая характеристика работы. Представленная диссертация объемом 130 страниц состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы (128 наименований) и приложения. Основное содержание работы целесообразно рассмотреть по главам.

Первая глава носит обзорный характер. В ней рассмотрены основные тенденции развития микрочиповых технологий для ПЦР, обсуждены современные варианты реализации т.н. цифровой ПЦР и выявлены наиболее значимые факторы, влияющие на результат анализа.

Обзор многочисленных источников позволил выявить цель диссертационной работы и сформулировать задачи исследования.

Вторая глава состоит из трех частей. В первой части сформулированы основные требования к конструкционным материалам, топологии и размерам элементов микрочиповых устройств. Во второй части второй главы приведены данные расчета температурного профиля в устройстве, состоящем

из плоского нагревателя и планарного микрочипа. В третьей части предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний на основе классических комбинаторных схем. На основании анализа результатов проведенных исследований во второй главе сформулировано следующее научное положение: *при условии случайного и равномерного распределения молекулярных колоний в реакционной камере применение классических комбинаторных схем (выбор без возвращения) позволяет оценить максимальное число колоний, регистрируемое с заданной погрешностью счета, при известных размерах молекулярных колоний и камеры*

В третьей главе представлены результаты исследований способов изготовления микрочиповых устройств и описаны полученные экспериментальные образцы. Были апробированы технологии изготовления микроструктур в полимерных подложках методами термоформования, механической и лазерной микрообработки. Для модификации поверхности полиметилметакрилата использовались химические растворы и ионизирующее излучение, в частности продемонстрирована эффективность использования высокочастотной плазменной обработки в кислородной среде.

Для определения режимов отверждения использовался неразрушающий оптический метод спектрофотометрии. Проанализированы спектры поглощения слоя фотоотверждаемой композиции в диапазоне 1550-2200 нм при продолжительности фотоотверждения от 0 до 60 минут и сформулирован критерий порогового типа, позволяющий установить факт отверждения фотоотверждаемой полимерной композиции по результатам измерений светопропускания в ближней инфракрасной области спектра. Критерий применялся для определения условий отверждения полимерной композиции. Таким образом, было сформулировано следующее научное положение: *фотоотверждение слоя полимерной композиции на акрилатной основе достигается при выполнении следующих условий: 1) оптическая плотность*

слоя в максимуме поглощения на длине волны 2110 нм меньше, чем оптическая плотность на длине волны 2138 нм; 2) оптическая плотность в максимуме поглощения на длине волны 1622 нм не превышает определенного порогового значения, зависящего от толщины слоя.

Методика контроля герметичности микрочиповых устройств с применением гравиметрического метода была усовершенствована за счет дополнительного учета влагопоглощения полимерных материалов. По результатам исследования было сформулировано следующее научное положение: *контроль герметичности микрочиповых устройств с применением гравиметрического метода должен осуществляться с учетом дополнительной поправки на влагопоглощение полимерного материала, величина которой определяется на основании спектрофотометрических измерений в ближней ИК области спектра.*

В четвертой главе приведены экспериментальные результаты, полученные при апробации изготовленных стеклянных и полимерных прототипов микрочиповых устройств. На прототипах микрочиповых устройств подтверждено, что применяемые полимерные материалы и композиции не оказывают влияния на эффективность реакции, а для многократного применения стеклянных микрочипов определен способ химической обработки реакционных камер после проведения ПЦР (с применением раствора гипохлорита натрия). Проведена оценка размеров регистрируемых колоний, полученных при амплификации фрагментов ДНК разной длины. Выявлена монотонно убывающая зависимость характерного размера молекулярных колоний от длины фрагмента ДНК (в диапазоне от 200 до 500 пар оснований). Экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом полоний. В четвертой главе было сформулировано следующее научное положение: *зависимость величины характерного радиуса молекулярных колоний от длины амплифицируемого фрагмента ДНК для метода молекулярных колоний с применением*

специфичных флуоресцентных зондов носит монотонно убывающий характер и хорошо аппроксимируется следующей зависимостью: логарифм величины радиуса молекулярных колоний линейно зависит от величины логарифма длины фрагмента ДНК с угловым коэффициентом (-1.49) и свободным членом 6.21 (коэффициент корреляции составляет 0.99).

По каждой главе сформулированы выводы.

В заключении приведены основные результаты и выводы работы.

По работе можно высказать следующие **замечания**:

1. В третьей главе на стр. 98 в качестве поправки на влагопоглощение приведено значение 0,2% от исходной массы полимера, а далее в тексте упоминается 2% от массы устройства. Какова итоговая величина?

2. Для сравнения поверхностных свойств полимера после целевой обработки оценивали изменение угла смачивания поверхности дистиллированной водой. Какие еще способы и методы можно использовать для этих целей, и почему использовали именно этот метод оценки поверхностных свойств?

3. В работе указано, что впервые сформулирована зависимость размера молекулярных колоний от длины фрагмента, однако тут же приводится сравнение с данными зарубежных исследований. Уточните, каковы отличительные особенности полученных результатов?

В целом, отмеченные замечания не затрагивают существа выносимых на защиту положений и не влияют на общую высокую оценку работы.

Заклучая можно заметить следующее. Диссертационная работа «Разработка микрочиповых устройств для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на современном научном уровне. Она посвящена разработке и созданию новых устройств для проведения экспериментальных исследований с целью изучения физических явлений и процессов, что соответствует формуле специальности 01.04.01. – Приборы и

методы экспериментальной физики. В автореферате раскрывается основное содержание диссертации, содержание диссертации и автореферата адекватно отражает основные результаты и научные положения, выносимые на защиту. Основные положения, полученные результаты и выводы обоснованы и соответствуют необходимым критериям научной новизны и практической значимости. Диссертация полностью отвечает всем требованиям ВАК РФ, изложенным в п.9. Положения ВАК РФ «О присуждении ученых степеней», (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Тупик Александра Николаевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики».

Официальный оппонент
доктор физико-математических наук,
научный советник лаборатории фотоэлектрических
явлений в полупроводниках
Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе
Российской академии наук
лауреат Государственной премии СССР
заслуженный деятель науки Российской Федерации
электронная почта: Ivanov.ivom@mail.ioffe.ru
тел. (812)2928983 факс (812)2971017
194021, г. Санкт-Петербург,
Политехническая улица, д. 26

Иванов-Омский Владимир Иванович