

«УТВЕРЖДАЮ»

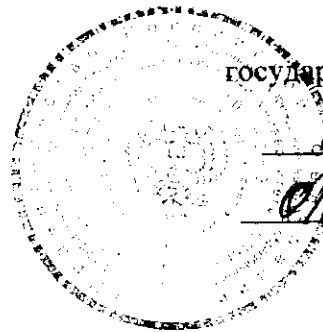
И. о. проректора по научной работе

Санкт - Петербургского

государственного университета

С.В. Микушев

2015 года



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Санкт-Петербургский государственный университет

на диссертацию 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

Развитие технологий в области медицины и биологии требует разработки эффективных методик и принципиально новых устройств и систем, которые могут быть использованы для решения широкого круга задач. В настоящее время огромное внимание уделяется применению микроаналитических систем в области биологических и медицинских исследований, при экологическом мониторинге и контроле состояния биосистем на молекулярном уровне. Разработка процессов автоматизированного и эффективного анализа биологических материалов с использованием минимальных объемов исследуемых проб является одной из наиболее актуальных задач современности. Соответствующие решения необходимы как для фундаментальных исследований, так и для непосредственного применения подобных систем при медицинской диагностике, в криминалистике, в биотехнологических разработках. Создание аналитических приборов нового поколения на основе изучения биоорганических субстанций востребовано в химических, биологических и медицинских исследованиях. Сказанное выше свидетельствует о несомненной актуальности выполненных в диссертационной работе ТУПИК Александры Николаевны исследований.

Диссертационная работа Тупик А.Н. посвящена разработке устройств для молекулярной диагностики и генетических исследований, проводимых с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей проводить синтез заданных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты в условиях циклического изменения температуры. ПЦР применяется для получения больших количеств специфических последовательностей

ДНК, необходимых при создании зондов, векторов, сенсорных слоев и др. ПЦР используется в лабораторной и медицинской практике для диагностики инфекционных, онкологических и других заболеваний, для поиска мутаций.

С развитием технологий появились работы по постановке ПЦР на специально созданных миниатюрных устройствах — микрочипах. В микрочиповых устройствах для ПЦР сформированы реакционные камеры, характеризующиеся высоким соотношением площади поверхности к объему, что позволяет осуществлять быстрый и эффективный теплообмен. Преимуществами микрочиповых устройств являются широкие возможности манипуляции пробой, малый расход анализируемого вещества и реагентов, быстрдействие, компактность. При этом существенное влияние на ход ПЦР оказывают свойства поверхности реакционных камер. Особенностью используемого подхода является выполнение требования об использовании ультрамалого количества тестируемого материала при эффективном анализе в присутствии примесей.

В последнее время активно внедряется способ проведения ПЦР в тонком слое полиакриламидного геля. Гелевая среда затрудняет диффузию синтезируемых фрагментов ДНК, поэтому они скапливаются в виде колоний вблизи соответствующей мишени - исходной молекулы ДНК. Регистрация колоний осуществляется за счет введения в реакционную смесь флуоресцирующих компонентов (флуоресцентно-меченых зондов или праймеров, красителей, встраивающихся в двухцепочечную ДНК, и др.). Используются специальные детектирующие системы, например, флуоресцентные сканеры. Такой метод позволяет обнаруживать и идентифицировать одиночные молекулы ДНК с определенными нуклеотидными последовательностями.

Для успешного развития и адаптации существующих технологий изготовления микрочиповых устройств при проведении ПЦР в гелевой среде и для надежной регистрации результатов с помощью флуоресценции необходимы комплексные исследования. Среди проблем, затрудняющих развитие методов ПЦР в геле, следует отметить отсутствие соответствующих детектирующих систем и адекватных материалов, используемых при создании микрочипов. В связи с этим диссертационная работа Тупик А.Н., которая посвящена разработке микрочиповых устройств для проведения ПЦР в гелевой среде, имеет бесспорную практическую значимость. Среди задач диссертационной работы ТУПИК Александры Николаевны, наряду с совершенно понятным подбором адекватных материалов и способов обработки их поверхности при создании реакционных камер с гелевым слоем, следует отметить заявленную разработку методик контроля герметичности систем, а также изготовление прототипов микрочиповых устройств для ПЦР в гелевой среде и их апробацию. Это позволило автору получить новые данные, представляющие научную и практическую ценность.

**Новизна** выполненных исследований заключается в определении связи между размером молекулярных колоний и длиной амплифицируемого фрагмента ДНК, в предложении способа оценки погрешности счета молекулярных колоний, а также в определении режимов формирования микроструктур в листовом полиметилметакрилате методами лазерной микрообработки и предложении способа восстановления работоспособности стеклянных микрочиповых устройств после проведения ПЦР.

**Достоверность** выносимых на защиту положений и полученных в диссертационной работе данных подтверждается повторяемостью результатов анализа изучаемых систем, их непротиворечивостью, хорошим согласием полученных результатов с результатами исследований, проведенных другими методами. Результаты исследований обсуждались на авторитетных конференциях и опубликованы в 13 печатных работах (из них 9 - в журналах, входящих в перечень ВАК РФ).

Тематика диссертации посвящена научным исследованиям по разработке и созданию новых экспериментальных устройств для изучения физических явлений и процессов, что соответствует формуле специальности 01.04.01 – приборы и методы экспериментальной физики.

Структура диссертации традиционна. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка принятых обозначений, списка литературы из 128 наименований, приложения (Акт внедрения результатов работы от 05.10.2015г.). Результаты диссертации представлены в виде 38 рисунков, 17 таблиц.

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи работы, отмечены научная новизна и практическая значимость исследования, приведены положения, выносимые на защиту, личный вклад автора. Представлен также список Всероссийских и международных конференций, на которых были представлены результаты работы. Излишним представляется раздел «Краткое содержание работы», в то время как список публикаций, в которых изложены основные результаты работы, напротив, имело смысл поместить именно во введении.

**Первая глава** диссертации, которая имеет не вполне удачное название «Литературный обзор», разделена на 5 частей. Часть 1.1 под названием «Актуальность» дает самые общие сведения о микрочипах, полимеразной цепной реакции ПЦР и содержит краткое рассмотрение аналитических микрофлюидных устройств (микрочипов) для исследования ПЦР. Вместе с тем, заявленное название раздела предполагает более глубокий анализ состояния проблемы, который в диссертации присутствует, но в другом разделе. В разделе 1.2 «Изготовление микрочиповых устройств» глубоко и подробно рассмотрены основные подходы и конструктивные решения при создании микрочиповых устройств, их топология, способы герметизации и особенности различных материалов, используемых при их изготовлении. Часть 1.3 посвящена анализу особенностей проведения ПЦП в микроформате, в части 1.4 рассмотрены способы проведения цифровой ПЦР. К сожалению, из текста не вполне ясно деление на методы и способы проведения ПЦР, заявленное в название раздела. Наконец, в разделе 1.5 подводится итог проведенного анализа литературы по теме исследования, обоснована цель работы и конкретизированы задачи исследования.

**Вторая глава** «Теоретические исследования» включает основные требования к материалам микрочиповых устройств, сведения о термических характеристиках материалах и оценку погрешности счета колоний. Сравниваются возможности стеклянных и полимерных материалов для изготовления микрочиповых устройств, предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний.

В главе 3 представлены результаты экспериментальных исследований по разработке и созданию микрочиповых устройств на основе стеклянных и полимерных материалов с использованием фотолитографии и кислотного травления, механической обработки, термоформования, лазерной микрообработки. Следует отметить, что адаптация метода лазерной микрообработки для изготовления планарных микроструктур в полимерных материалах дает возможность оперативно создавать большое количество микрочиповых устройств с реакционными камерами произвольной формы. Для герметичного соединения пластин микрочиповых устройств с защитными пластинами в работе используется термическое связывание и склеивание полимерными композициями. По результатам измерений светопропускания фотоотверждаемого клеевого слоя в ближней инфракрасной области предложен критерий отверждения полимерных композиций, применение которого позволяет контролировать склеивание и герметизацию микроструктур. Герметичность микрочиповых устройств изучалась с использованием гравиметрического метода с учетом влагопоглощения материалов.

В главе 4 представлены результаты апробации микрочиповых устройств. Показано, что результаты, полученные на микрочиповых устройствах, хорошо соотносятся с результатами, полученными методом ПЦР в реальном времени на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32. Проанализирована связь между размером колоний и длиной фрагмента ДНК (в диапазоне от 200 до 500 пар оснований).

**Заключение** содержит перечень основных результатов работы. Выводы, сделанные в диссертации на основании анализа большого массива данных, представляются обоснованными.

В целом диссертация написана хорошим языком, содержит достаточное количество рисунков и таблиц, иллюстрирующих полученные данные. Следует подчеркнуть, что проведенные Тупик А. Н. исследования вносят заметный вклад в разработку новых эффективных методик и создание приборов для развития биотехнологических подходов и проведения социально значимых диагностических процедур. Разработанные микрочиповые устройства на основе стеклянных и полимерных материалов с закрытыми реакционными камерами для проведения ПЦР в гелевом слое позволят значительно сократить трудоемкость процедуры. Предложенные в работе технологии, режимы, способы изготовления микрочиповых устройств, в том числе с использованием методов лазерной микрообработки для формирования микроструктур в листовом полиметилметакрилате, позволят эффективно использовать процедуру ПЦР, а также оперативно создавать однотипные заготовки для микрочиповых устройств.

Основные научные результаты диссертации изложены в 13 печатных работах, из них 9 опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК. Публикации соискателя полностью отражают содержание диссертации и подтверждают личный вклад автора в выполненные исследования. Результаты диссертации были представлены на международных и всероссийских конференциях. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

## Вопросы и замечания к работе:

1. В работе предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний, на основе которого предполагается вычислять максимальное число колоний при определенных условиях анализа образцов. Как соотносится предложенный в работе способ оценки погрешности счета колоний с данными независимых экспериментов?
2. При проведении ПЦР необходимо многократно изменять температуру образца (около 60 циклов изменения температуры от 60 до 95° С). Как достигалась равномерность нагрева и охлаждения геля при изменении температуры?
3. Несмотря на общую целостность и логичность работы, следует отметить не вполне удачное представление данных, встречающееся в диссертации. Например, рис. 3.14 содержит кривые, обозначенные как а и b, но в подписи к рисунку о них ничего не сказано, хотя далее в тексте и дается описание приведенных кривых. В таблице 3.6 отсутствует погрешность измерений, хотя общая погрешность определения потери массы в тексте представлена. На рис. 4.3 и 4.4 приведены данные, касающиеся изменения флуоресценции образцов в зависимости от номера цикла, но никаких данных о флуорофоре и длинах волн возбуждения и флуоресценции не приведено.
4. В работе встречаются пунктуационные ошибки и опечатки.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не опровергают научной новизны, значимости результатов диссертационного исследования, а также состоятельности защищаемых положений.

В целом Диссертационная работа Тупик А.Н. является самостоятельной завершенной научно-исследовательской квалификационной работой, успешно решающей целый ряд актуальных задач в области разработки микрочиповых устройств для проведения полимеразной цепной реакции. Полученные Тупик А.Н. результаты представляют практический интерес и могут быть использованы в научно-исследовательских и производственных организациях, выполняющих научные исследования и конструкторские разработки по Приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники РФ в области создания и усовершенствования аналитического оборудования, внедрения новых методов и подходов для биологии, биотехнологии, медицины. К таким организациям относятся ФГБУН Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН (Москва), Экспериментальный завод научного приборостроения со Специальным конструкторским бюро РАН (г. Черноголовка), АО «Научные приборы» (Санкт-Петербург), «СИНТОЛ» (Москва), «Лазерный центр» (Санкт-Петербург). Результаты работы могут также использоваться в таких учреждениях, как ФГБУН Институт фундаментальной биологии и биотехнологии СО РАН (г. Красноярск), НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой (Санкт-Петербург), НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). Научные результаты исследования могут быть использованы в Институте высокомолекулярных соединений, Институте цитологии, Институте молекулярной биологии, Физико-техническом институте РАН, в Санкт-Петербургском, Московском, Новосибирском университетах и иных научных и

учебных заведениях, занимающихся исследованием ДНК и разработками структур на ее основе.

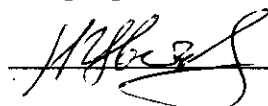
По научной новизне, актуальности, объему и обоснованности научных результатов диссертационная работа ТУПИК Александры Николаевны полностью отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук. Работа соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения научных степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 № 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

Диссертационная работа доложена Турик А. Н. на научном семинаре кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Санкт-Петербургского государственного университета 10 ноября 2015 года. Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Санкт-Петербургского государственного университета и утвержден протоколом 88.08/21-04-16 от 27 ноября 2015 года.

Отзыв на диссертацию подготовлен д.ф.-м.н., проф. Н.А. Касьяненко

И.о. заведующего кафедрой молекулярной  
биофизики и физики полимеров СПбГУ,  
доктор физ. - мат. наук, профессор

 Н. В. Цветков

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,

Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9.

Электронная почта: [N.Tsvetkov@spbu.ru](mailto:N.Tsvetkov@spbu.ru), тел. 428-43-82.

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

[n.kasyanenko@spbu.ru](mailto:n.kasyanenko@spbu.ru) Тел. 428-43-88

