

“УТВЕРЖДАЮ”

Заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН) по научной работе, д.т.н.

А.А. Евстапов



### ПРОТОКОЛ № 9

заседания научного семинара Института аналитического приборостроения РАН от 13.10.2016 г.

#### **Присутствовали:**

Д.т.н.: Курочкин В.Е., Евстапов А.А., Манойлов В.В.

Д.б.н.: Кисляков Ю.Я., Кислякова Л.П.

Д.ф.-м.н.: Буляница А.Л., Новиков Л.В., Фофанов Я.А.

К.т.н.: Бардин Б.В., Тупик А.Н., Заруцкий И.В.

К.ф.-м.н.: Белов Ю.В., Щербаков А.П.

Научные сотрудники и аспиранты.

Всего присутствовало 17 человек.

#### **Программа заседания:**

Обсуждение диссертационной работы Петрова Александра Ивановича «Исследование и практическая реализация программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики».

#### **Слушали:**

Доклад Петрова А.И. по материалам диссертации. В докладе изложены основные научные проблемы по теме диссертационной работы, подходы, которые способствовали решению этих проблем, рассматриваются основные научные результаты работы, на основании которых сформулированы науч-

ные положения, выносимые на защиту. Докладчику было задано 11 вопросов, на которые были получены исчерпывающие ответы.

В обсуждении приняли участие 9 человек (Кислякова Л.П., Манойлов В.В., Новиков Л.В., Заруцкий И.В., Бардин Б.В., Буляница А.Л., Курочкин В.Е., Кисляков Ю.Я., Фофанов Я.А.).

### **Постановили:**

Принять заключение семинара Института аналитического Приборостроения РАН о диссертационной работе Петрова А. И. «Исследование и практическая реализация программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики».

### **Заключение семинара:**

#### **1. Актуальность работы**

В последнее десятилетие произошло активное внедрение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лабораторную и диагностическую практику. Благодаря своей скорости, высокой специфичности и чувствительности, он получил широкое применение в первую очередь в клинической диагностике. Появление флуоресцентных методов детекции накопления продуктов в процессе реакции (ПЦР в реальном времени, ПЦР-РВ) открыло дополнительные преимущества в использовании этого метода анализа, в частности, возможность количественной оценки содержания молекул нуклеиновых кислот в исследуемом образце.

Для проведения ПЦР-РВ используют специальные приборы, способные одновременно осуществлять термостатирование образцов с быстрыми переходами между температурами по заданной программе и регистрацию сигнала флуоресценции образцов на заданных длинах волн, соответствующих применяемым флуоресцентным красителям. К приборам такого класса можно отнести модели «iQ5», CFX96 («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «RotorGene 6000» (CorbettResearch, Австралия), «StepOne» (Applied-Biosystems, США), DT-48, DT-96 (НПФ ДНК-Технологии, Россия) и АНК-32 (ИАП РАН, Россия).

Важнейшая роль в составе таких анализаторов отводится аппаратным и программным средствам, образующими аппаратно-программные комплексы анализаторов нуклеиновых кислот (АПК АНК). АПК АНК позволяют обес-

печить полную автоматизацию управления процессом ПЦР, измерения сигналов флуоресценции и анализа кинетики происходящей реакции. АПК АНК позволяют реализовать эффективные методы обработки данных для достижения высоких аналитических характеристик приборных комплексов и осуществлять непрерывный контроль работоспособности технических средств.

Как правило, АПК каждого производителя – это закрытые системы, обладающие как аппаратным, так и программным ноу-хау, дополнительно защищенные целой серией патентов. К тому же, методы анализа ДНК быстро и постоянно развиваются, что в свою очередь требует непрерывного и быстрого совершенствования АПК. Совершенствованию аппаратной части служит постоянно развивающаяся элементная база, особенно в части микроконтроллеров и силовых элементов управления. Стремительное развитие информационных технологий так же предоставляет новые возможности для формирования информационной среды поддержки АПК АНК, что весьма благоприятно сказывается на развитии методов анализа ДНК.

Учитывая стратегическую важность указанных приборов, в Институте аналитического приборостроения Российской академии наук была разработана серия АПК АНК - специализированных приборов для экспресс-анализа нуклеиновых кислот: АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, Нанофор-05.

В результате для создания собственных АПК АНК потребовалось разработать новые эффективные подходы к проектированию аппаратной части и к построению программного обеспечения АПК АНК, что и определило актуальность темы диссертации.

**2. Научная новизна** работы состоит в развитии принципов создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ. В результате исследований автором получены следующие основные научные результаты:

- Впервые экспериментально исследованы тепловые характеристики амплификатора на элементах Пельтье при проведении ПЦР-РВ для пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Axugen", PCR-0.2D-C).
- Синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка его величины является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определяет устройство, его реализующее и оценивает погрешность его работы.

—Впервые предложен классификатор кинетических кривых на основе анализа первой производной, что позволило сформировать критерий наличия роста продукта ПЦР и/или выявить аномальность процесса амплификации.

—Установлено, что для аппроксимации кинетической кривой на экспоненциальном (начальном) участке лучше всего подходит цензурированная сигмоидная функция.

### **3. Практическая значимость работы:**

Проведенные исследования позволили уточнить механизм тепловых процессов амплификации в приборах АНК. Установлены параметры режимов питания элементов Пельтье при нагреве и охлаждении, что позволило увеличить скорость нагрева в 2 раза, а охлаждения в 1.2 раза. Полное время анализа при этом сократилось на 10–15 мин.

Показано, что увеличение скорости нагрева более  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$  ( $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$ ) приводит к большой разности температур реакционной смеси (больше  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в пределах пробирки), тем самым, ухудшая эффективность проведения ПЦР-реакций.

Разработанные алгоритмы первичной и вторичной обработки сигналов легли в основу программного обеспечения для серийно выпускаемых приборов серии АНК.

Разделение алгоритмов управления на проблемно-ориентированный язык (ПОЯ) и автоматный язык (АЯ) повысило надежность работы АНК и позволило использовать одно и то же программно-математическое обеспечение для различных типов приборов.

**4. Личное участие** Петрова А.И. состоит в осуществлении теоретических и экспериментальных исследований, в отработке алгоритмов управления АПК АНК, в создании и тестировании алгоритмов обработки.

Проводилось руководство коллективом разработчиков ИС в части планирования работ и проведения разработки АПК АНК.

Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Результаты работы изложены в 8 научных статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, трех тезисах и докладах конференций, трех патентах.

Статьи и материалы конференций:

1. Абсолютное определение сверхмалых количеств ДНК в пробе методом ПЦР в реальном времени. Алексеев Я.И., Курочкин В.Е., Благодатских

- К.А., Сочивко Д.Г., Федоров А.А., Петров Д.Г., **Петров А.И.**, Чубинский-Надеждин И.В. //Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симп. С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине», С. 215-216.
2. Высокпроизводительный анализатор с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований. Курочкин В.Е., Белов Ю.В., Коновалов С.В., **Петров А.И.** //Там же, С. 240-241.
  3. Информационная система для лабораторий генетического анализа. Курочкин В.Е., Белов Ю.В., **Петров А.И.**, Сычев К.С. //Там же, С.241-243.
  4. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., **Петров А.И.**, Петряков А.О., Румянцев Д.А. Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В.. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение, 2006. Т. 16. № 3. С. 132-136.
  5. Белов Ю.В., Лавров В.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.** Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 1. С. 44–49.
  6. Белов Ю.В., Лавров В.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.** Изучение влияния шумов детектора на погрешности количественных анализов нуклеиновых кислот на приборах ПЦР-РВ // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 2. С. 27–33.
  7. Белов Ю.В., Лавров В.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.** Оптимизация параметров сигмодалной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени. // Научное приборостроение. 2011. Т.21, № 3. С.130–134.
  8. Белов Ю.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.** Исследование погрешностей моделирования сигмодалной функцией сигналов полимеразной цепной реакции в реальном времени. // Научное приборостроение. 2011. Т.21, № 4. С. 28-34.
  9. Белов Ю.В., Курочкин В.Е., **Петров А. И.** Двухкомпонентный количественный ПЦР-анализ // Научное приборостроение. 2012. Т.22, № 4. С.72-76.
  10. Белов Ю.В., **Петров А.И.**, Курочкин В. Е.. Многокомпонентный количественный ПЦР-анализ // Научное приборостроение. 2013. Т.23, № 2. С 5-8.
  11. **Петров А.И.** Переход от проблемно-ориентированного языка к автоматному при проектировании аналитических приборов. //Научное приборостроение. 2016. Т.26, № 2. С.82–92.

#### Патенты РФ:

1. Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., **Петров А.И.**, Петряков А.О., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. // Патент на изобретение № 2304277 G01N 21/63 23.06.2005
2. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., **Петров А.И.**, Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. // Патент на изобретение № 2418289 G01N 21/64 25.11.2009
3. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., **Петров А.И.**, Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. // Патент на полезную модель №110864 G01N 21/64 31.10.2011

**5. Достоверность** результатов подтверждена тем, что разработанные программно аппаратные комплексы успешно используются более чем в 300 приборах АНК для биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораторий, а также в лабораториях СЭС, МО РФ и клинических лабораториях поликлиник и больниц.

**6. Все полученные** автором результаты являются новыми.

**7. Результаты** работы были представлены и обсуждались на всероссийских и международных конференциях и семинарах.

**8. Диссертация** соответствует профилю специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики» и удовлетворяет всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук.

В диссертации:

— Экспериментально установлены правила определения рабочих параметров (мощность, подводимая к элементу Пельтье, и время задержки перед началом измерений) тепловых блоков приборов АНК.

— Осуществлен синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции для оптического блока приборов АНК.

— Создан проблемно ориентированный язык управления экспериментом и автоматный язык управления аппаратной частью прибора АНК.

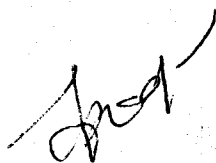
— Разработаны алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.

— Создано четыре версии программного обеспечения для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе ПЦР-РВ (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64 и АНК-96).

Тематика диссертационной работы соискателя полностью соответствует паспорту специальности 01.04.01, а именно, п. 2 «Разработка новых принципов и методов измерений физических величин, основанных на современных достижениях в различных областях физики и позволяющих существенно увеличить точность, чувствительность и быстродействие измерений. Разработка и создание научной аппаратуры и приборов для экспериментальных исследований в различных областях физики» и п. 7 «Разработка и создание средств автоматизации физического эксперимента» согласно Областям исследования. Также отмечается соответствие отрасли технические науки, поскольку диссертация относится к «разработке научной аппаратуры и приборов для физических исследований, вносящих значительный вклад в научно-технический прогресс, либо содержащие оригинальные технические решения».

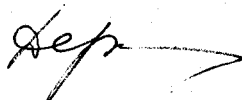
9. Учитывая вышеизложенное, научный семинар Института аналитического приборостроения РАН рекомендует диссертационную работу Петрова Александра Ивановича «Исследование и практическая реализация программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени» к защите на соискание ученой степени кандидата технических наук в диссертационном совете Д002.034.01 на базе ИАП РАН по специальности 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной физики».

Председатель семинара,  
д.ф.-м.н., главный научный сотрудник



Я.А. Фофанов

Секретарь



А.А. Державец