

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Полины Константиновны Афоничевой «Разработка микрофлюидных устройств с интегрированными твердотельными наноструктурами для регистрации биомолекул», представленную на соискание учёной степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики**

В начале 2000-х годов достаточно четко обозначился положительный тренд в развитии высокочувствительных и, одновременно быстродействующих и экономически привлекательных, биоаналитических систем с интегрированными микро- и наноструктурами для определения химических и биологических агентов, определяющих состояние окружающей среды, качество продуктов промышленного производства и безопасное существование человека, животных, растений, а также для выделения нуклеиновых кислот и их секвенирования. В этом отношении весьма привлекательно выглядят достижения в области создания новых методов микро- и нанофлюидики в сочетании с технологиями микроэлектроники, принцип действия которых основан на взаимодействии исследуемых аналитов с твердотельными наноразмерными нанопорами и наноканалами. Уже сейчас нанопоровое детектирование эффективно объединяет простоту, компактность оборудования и скорость проведения анализа. Ярким примером являются нанопоровые секвенаторы - портативные устройства для прямого секвенирования ДНК и РНК в реальном времени. В основе таких приборов ячейки с нанопоровыми транспортными белками, каждый из которых предназначен для анализа отдельной молекулы нуклеиновой кислоты.

Вместе с тем, ряд неудовлетворительных эксплуатационных характеристик биологических пор (стабильность, жесткие условия хранения и применения) выдвигает задачу создания твердотельных нанопор с характеристиками, которые не уступают порам биологического происхождения. Современные методы изготовления твердотельных наноструктур позволяет создавать нанопоры и наноканалы контролируемых

форм и размеров. Для успешного решения задачи создания твердотельных нанопор необходимо создать основательный фундаментальный базис, позволяющий обеспечить достаточную чувствительность, высокую скорость электрофоретической транслокации аналитов, описание процессов ионного и молекулярного транспорта, корректную математическую обработку измеряемых сигналов.

Учитывая сказанное выше, можно утверждать, что тема диссертационной работы Полины Константиновны Афоничевой «Разработка микрофлюидных устройств с интегрированными твердотельными наноструктурами для регистрации биомолекул» представляется вполне актуальной и направлена на решение одной из важнейших задач по созданию интегрированных микро- и наноструктур для аналитических и молекулярно-диагностических целей.

В соответствии с выбранной темой соискатель провел разработку и создал устройства для обнаружения (регистрации) молекул ДНК с использованием измерения ионного тока при транслокации молекул через твердотельные нанопоры/наноканалы. В рамках диссертационной работы были сформулированы и решены следующие задачи:

- разработка и изготовление кремний-стеклянного микрофлюидного устройства (МФУ) с наноканалами методами оптической литографии и травления сфокусированным ионным лучом;

- исследование ионного транспорта в наноканалах методами измерения ионной проводимости и оптической микроскопии;

- разработка и изготовление электрохимической измерительной ячейки, содержащую *cis*- и *trans*- объемы со встроенной SiN<sub>x</sub>/Si мембраной с одиночной нанопорой, с применением метода фотополимерной 3D печати;

- разработка: протокола подготовки электрохимической ячейки и методики проведения эксперимента для исследования влияния концентрации электролита на проводимость нанопоры;

- исследование ионного транспорта в твердотельной SiN<sub>x</sub>/Si мембране с одиночной нанопорой при изменении концентрации электролита KCl;

- исследование возможности автоматизации и оценка эффективности выделения НК на магнитных частицах в чипах из полидиметилсилоксана (ПДМС) в сравнении с ручным выделением с целью дальнейшего использования данной процедуры для экспериментальных исследований молекул;

- исследование возможности детектирования фрагментов ДНК различной длины с помощью электрохимической ячейки с одиночной нанопорой в SiN<sub>x</sub>/Si мембране.

Диссертация содержит 4 главы, посвященные решению упомянутых выше задач. Кроме того, работа содержит введение, заключение, список используемых источников, содержащий ссылки на 180 источников, разделы благодарности и обозначения и сокращения. Всего 135 страниц.

**Введение** посвящено обоснованию выбора темы исследования, актуальности работы, оценке степени разработанности темы, формулировке цели, задач, методологии и методам исследования. Во введении также формулируется научная новизна и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, указаны конференции, где были представлены результаты работы, личный вклад автора, структура работы, описание публикаций по теме работы. Эта часть работы написано четко и ясно.

Анализ **1-го раздела работы (литературного обзора)** позволяет сделать заключение, что автором проведено широкое исследование публикаций в следующих областях: микро- и наноструктуры для биомедицинских исследований, технологии и материалы для изготовления микро- и наноструктур и их интеграция в микрофлюидные чипы, свойства нанопор и наноканалов в части ионного транспорта и селективности, способам управления транспортом биомолекул в микро- и наноструктурах, особенностям экспериментальных исследований с использованием наноразмерных устройств и областям применения описанных наноструктур

при обнаружения молекул, создания биодатчиков и проведения секвенирования. В заключении литературного обзора автор подчеркивает актуальность исследований в области микро- и нанофлюидики, направленных на разработку новых устройств с интегрированными наноструктурами, принцип действия которых основан на взаимодействии твердотельных нанопор/наноканалов с исследуемыми молекулами. Безусловно положительное впечатление производит полный и широкий охват современных публикаций в рассматриваемых областях. В качестве замечания по этой части работы можно отметить не полную корректность использования термина «концентрация соли» при описании двойного электрического слоя (стр. 29,30, подпись к рис. 1.4.). Более корректно использовать термин «ионная сила раствора». Мне не совсем понятно утверждение на стр.37 «захват однонитевых ДНК происходит только за счет значительного снижения энтропии». Как снижение энтропии способствует захвату? На стр. 52 утверждается, что изоэлектрическая точка нанопористого материала нитрида кремния около 5. Как же производится измерение изоэлектрической точки этого материала? Вместе с тем, спешу отметить, что высказанные замечания не искажают общего положительного впечатления от этой части работы.

Изложению собственно результатов работы автора посвящены три последующие главы.

**Во второй главе** П.К. Афоничева представила данные по разработке и изготовлению кремний-стеклянного микрофлюидного устройства (МФУ) с наноканалами и описала исследование ионной проводимости наноканалов. Автору удалось создать оригинальную топологию X-образной формы, представляющая собой два микроканала и разделяющую их тонкую мембрану с наноканалами. Заслуживает особого внимания примененный автором метод анодного сваривания, который позволяет создать прочное соединение между поверхностью кремния (оксида кремния) и покровным боросиликатным стеклом толщиной 450 мкм, шероховатость которого составляла менее 5 нм. Полученные в итоге структуры и охарактеризованы методами атомно-силовой

и растровой электронной микроскопии. Методом измерения ионной проводимости исследованы транспортные свойства наноканалов.

**В третьей главе** автором представлены исследования твердотельных нанопор в свободноподвешенной SiNx/Si мембране, подробно описано изготовление электрохимической измерительной ячейки, а также протокол ее подготовки и методика эксперимента по изучению механизмов селективного ионного транспорта. Исследована ионная проводимость изготовленных нанопор. Определен эффективный диаметр (5 нм) пор при концентрации KCl 1M, что хорошо согласуется с результатами ПЭМ-исследования.

**В четвертой главе** описаны экспериментальные исследования, связанные с выделением и обнаружением нуклеиновых кислот. Исследована эффективность выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах в разработанном автором микрофлюидном чипе. Эффективность выделения оценена методом ПЦР-РВ в ПДМС чипах при использовании принятой лабораторной методикой и составила величины  $\alpha \approx 28\%$  и  $\alpha \approx 33\%$ , соответственно. Отмечу, что способ выделения позволяет автоматизировать процесс, устранить влияния человеческого фактора и может использоваться для получения образцов, подходящих для исследования транспорта НК в наноразмерных структурах. Далее автором проведены эксперименты по регистрации фрагментов ДНК с различным количеством пар оснований (п.о.) 10000, 5000 и 500 под действием электрофореза при их прохождении через твердотельную нанопору. По полученным результатам построена зависимость амплитуды транслокаций от их продолжительности, демонстрирующая возможность одномолекулярного детектирования. Для анализа событий транслокаций использовалась процедура обработки для обнаружения событий по пороговому значению тока. Анализ событий осуществлялся в три этапа: построение и вычитание базовой линии, поиск событий транслокаций по пороговому значению тока, фильтрация событий и последующий анализ достоверных данных. Для фрагментов ДНК 10000 п.о. количество событий после добавления ДНК изменилось с 11 событий до 136 событий. Построено

двумерное распределение плотности транслокаций фрагментов ДНК, центр тяжести распределения находится в области коротких продолжительностей транслокаций (до 2 мс), подтверждая природу транслокаций, связанную с перемещением фрагментов ДНК через нанопору под действием электрофоретических сил. Результаты экспериментов по детектированию фрагментов ДНК 5000 и 500 п.о. свидетельствуют о существовании зависимости длительности событий транслокаций от молекулярной массы фрагментов ДНК. Выявлено, что при уменьшении молекулярной массы ДНК в 10 раз, продолжительность транслокаций снижается на 35%.

При знакомстве с экспериментальными данными у меня возник ряд вопросов и замечаний.

В заключении к главе 2 (стр.76, 77) приведены параметры наноканалов и плотности тока, значения которых не подтверждены экспериментальными данными в основной части главы.

В заключении к главе 3 (стр.98) приведено значение эффективного диаметра пор – 5 нм, но в основном тексте главы я не нашел экспериментов для других значений диаметра пор. Почему же это значение называется оптимальным?

На странице 105 не указано какого размера пора была использована в эксперименте.

Чем эксперимент, данные которого приведены на рис. 4.6, отличается от эксперимента, данные которого приведены на рис.4.7?

На стр.112 делается вывод о влиянии длины молекул ДНК на продолжительность транслокации. Это не вполне корректно. Молекулы ДНК размером в 500 п.о. – это практически линейная структура. А вот молекулы ДНК размером 5000 и 10000 п.о. представляют собой скорее глобулы (статистические клубки). Поэтому корректнее говорить о молекулярной массе ДНК.

Было бы удобно и очень информативно свести результаты по транслокации ДНК в таблицу, где можно было бы указать три усредненных

параметра: продолжительность транслокации, пиковая амплитуда, количество транслокаций и координаты «центра тяжести» распределения.

Вместе с тем, высказанные замечания не искажают общего положительного впечатления от работы П.К. Афоничевой. Результаты, полученные автором, содержат очевидные признаки научной новизны и имеют неоспоримую практическую значимость.

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 печатных трудах, из которых 5 входят в перечень журналов ВАК, 7 публикаций — в международные реферативные базы данных и систему цитирования Scopus. Соискателем проведена положительная апробация результатов исследования на международных и всероссийских научных конференциях.

Изучение диссертации, автореферата и опубликованных автором работ позволяет сделать вывод о том, что исследование проведено соискателем самостоятельно, диссертация написана лично автором, на высоком научном и профессиональном уровне, с использованием современных методов научных исследований и цифровых технологий, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты, выдвигаемые на публичную защиту, является законченным научным трудом, имеющим теоретическое и практическое значение. Опубликованные работы в достаточной степени отражают содержание и основные результаты, полученные автором диссертации.

Таким образом, в диссертационной работе П.К. Афоничевой «Разработка микрофлюидных устройств с интегрированными твердотельными наноструктурами для регистрации биомолекул» разработаны и созданы устройства для обнаружения молекул ДНК с использованием измерения ионного тока при транслокации молекул через твердотельные нанопоры/наноканалы.

На основании изложенного считаю, что диссертационная работа «Разработка микрофлюидных устройств с интегрированными твердотельными наноструктурами для регистрации биомолекул» полностью

соответствует паспорту научной специальности 1.3.2. - Приборы и методы экспериментальной физики и требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Афоничева Полина Константиновна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики.

**Официальный оппонент,  
доктор химических наук, профессор,  
директор ФГБУН «Институт биохимической  
физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»  
119334, Москва, ул. Косыгина д.4,  
+7(499) 137-64-20, [director@sky.chph.ras.ru](mailto:director@sky.chph.ras.ru)**

25.04.2025



**И.Н. Курочкин**

Подпись И.Н. Курочкина удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН  
кандидат биологических наук

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Skalackaya S.I.", is written on a light-colored background.

Скалацкая С.И.