

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФИЦ Биотехнологии РАН

119071, г. Москва, Ленинский проспект, 33/2.

член корр. РАН В.О. Попов



2019 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу ПОПОВА А.М.

«МИКРОФЛЮИДНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И МЕХАНИЗМОВ ИХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ НА ИСТОЧНИКЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ»,

представленную на соискание учёной степени кандидата  
физико-математических наук  
по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики»

Микрофлюидика является междисциплинарной наукой, описывающей поведение ультрамалых объёмов и потоков жидкостей. Данный раздел науки находится на стыке различных областей физики, химия и биологии, что определяет и широкое практическое применение микрофлюидных устройств (МФУ): в нефтехимии, промышленности, молекулярной биологии и фармакологии. Основными достоинствами МФУ являются: уменьшение объема образца и расхода реактивов, удобное управление процессами смешивания жидкостей, разнообразие геометрии инструментов для работы с жидкостями, возможность манипуляций с мелкими каплями (клетками), быстрый перенос массы в результате высокого соотношения поверхности и объема. Указанные достоинства определили интерес микрофлюидного направления применительно к области кристаллизации макромолекул, ввиду сложности получения многих веществ (в частности, белковых соединений) в чистом виде в больших количествах.

Кристаллизация является важной и необходимой стадией структурного исследования макромолекул методом рентгеноструктурного анализа – основного метода структурных исследований на сегодня. Особые свойства макромолекул, в том числе: конформационная гибкость, наличие нескольких минимумов растворимости, склонность к агрегации и денатурации, существенно затрудняют, а иногда и делают невозможной их кристаллизацию. Таким образом, стадия кристаллизации до сих пор остается в большей степени эмпирической и наименее прогнозируемой стадией структурного исследования, заключающейся, в конечном счете, в переборе большого числа различных точек кристаллизационного пространства (кристаллизационном скрининге). Очевидно, что разработка технологии получения МФУ для кристаллизации макромолекул, позволяющего точно контролировать объемы и процесс смешивания жидкостей, существенно уменьшать расход исследуемого вещества, а также проводить структурные исследования полученных кристаллов *in situ*, является важной задачей и определяет **актуальность** исследования, изложенного в диссертации.

В диссертации рассматривается разработка технологической цепочки, обеспечивающей относительно малую стоимость и высокую скорость разработки и создания МФУ для кристаллизации белков методом микробатч, позволяющих также проводить *in situ* анализ как самого процесса кристаллизации методом малоуглового рентгеновского рассеяния, так и рентгеноструктурный эксперимент полученных кристаллов непосредственно в МФУ. Подобные серийно выпускаемые МФУ могут найти применение как в научных организациях, так и в биотехнологических и фармпредприятиях, занимающихся структурными исследованиями с привлечением метода рентгеноструктурного анализа.

Во **введении** обоснована актуальность разработки простых и дешевых способов создания МФУ для различных научно-технологических областей. Сформулированы цели и задачи работы, их научная новизна и практическая



значимость, описана структура диссертации и кратко изложено содержание по главам. В **первой главе** диссертации проводится обзор литературных источников в части способов изготовления МФУ и областей их применения. Во **второй главе** приведено описание экспериментальных методик, оборудования и материалов, использованных в ходе исследования. Детально описана методика формирования микроканалов на углекислотном лазерном гравере методом абляции. Дано обоснование выбора данного способа формирования каналов, как одного из наиболее доступных с точки зрения стоимости расходных материалов и оборудования, а также простоты его использования. **Третья глава** диссертации посвящена описанию результатов проведенных работ по разработке технологической цепочки создания МФУ из полиметилметакрилата (ПММА). Проведено сравнение ПММА с другими материалами, используемыми для разработки МФУ, и обоснован выбор ПММА, что связано с высокой скоростью и относительной легкостью его обработки без привлечения литографических методов, а также высокой прозрачностью для рентгеновского излучения, используемого для рентгеноструктурного анализа и малоуглового рентгеновского рассеяния. Описаны основные технологические этапы создания МФУ, включая обоснование используемого метода формирования каналов (лазерной гравировки) и метода сращивания пластин МФУ (термическая спайка). Детально описан процесс контроля качества получаемых результатов на всех стадиях создания МФУ. Отдельный раздел главы посвящен модификациям свойств МФУ, в том числе изменению гидрофобности (смачиваемости) каналов. **Четвертая глава** посвящена непосредственно созданию прототипа МФУ для кристаллизации белков методом микробатч с последующим анализом выращенных кристаллов *in situ* методом рентгеноструктурного анализа. Проведен анализ оптимальной геометрии каналов МФУ и режима потока веществ, подобран тип жидкости-носителя и объем капель исследуемого вещества. Эксперимент по микробатч кристаллизации проведен на трех

различных тестовых белках, включая лизоцим, используемый в качестве классического тестового белка в структурной биологии. Описана методика и результаты сравнительного тестирования полученных кристаллов методом рентгеноструктурного анализа (предел дифракции, параметры кристаллической ячейки, точечная группа симметрии) как непосредственно в МФУ, так и после их извлечения. В **пятой главе** описано создание МФУ для исследования начальных стадий кристаллизации белков *in situ* методом малоуглового рентгеновского рассеяния при малом расходе исследуемого вещества (10-20 мкл). Предложена и испытана конструкция разборной ячейки из ПММА с плоскопараллельными окнами, достаточно простая в изготовлении и позволяющая изменять ее характеристики, например, использовать окна из разных материалов, изменять толщину кюветы, ее объем и конфигурацию. Описаны и проанализированы результаты использования подобной ячейки с тестовым белком - лизоцимом, показывающие принципиальную возможность использования данного типа МФУ для проведения *in situ* экспериментов по малоугловому рентгеновскому рассеянию.

Среди **важнейших результатов**, полученных в ходе работы исследования, следует отметить следующие:

1. Разработана технологическая цепочка для быстрого прототипирования и создания разборных МФУ из ПММА методами лазерной гравировки и термической спайки. Достигнуто значительно упрощение процесса изготовления МФУ в сравнении с альтернативными методами.

2. Разработанная технология создания МФУ из ПММА позволила изготовить прототип устройства для кристаллизации белков методом микробатч, требующий существенно меньшие объемы исследуемых веществ по сравнению с традиционными техниками кристаллизации и допускающий возможность проведения рентгеноструктурного эксперимента полученных кристаллов непосредственно в МФУ. Показано, что подобное устройство позволяет:



- идентифицировать выросшие белковые кристаллы;
- отбирать для эксперимента кристаллы наилучшего качества (лучший предел дифракции, меньшая мозаичность и пр.) без вскрытия МФУ;
- без извлечения закристаллизованного белка из МФУ получать в ряде случаев дифракционные данные с разрешением, достаточным для установления пространственной структуры.

- осуществлять многократное (до трёх раз) вскрытие МФУ для извлечения/загрузки исследуемого материала и повторной термической спайки без ухудшения качества изделия.

3. Разработан прототип МФУ из ПММА с плоскопараллельными кварцевыми окнами для проведения *in situ* исследований белковых растворов методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Полученные в разработанном МФУ кристаллы белков, их дифракционные картины, а также данные малоуглового рентгеновского рассеяния определяют **новизну** работы, демонстрируя применимость разработанных МФУ для решения задач структурной биологии.

**Достоверность** результатов диссертации определяется воспроизводимостью экспериментов, применением стандартных технологий для получения МФУ и регистрации данных структурных методов, а также соответствием экспериментальных дифракционных данных данным, полученным ранее аналогичными методами для того же набора объектов.

Содержание диссертации и отзыва обсуждено на научном семинаре в ФИЦ Биотехнологии РАН от 24.01.2019. Основные **замечания** и **вопросы** к диссертационной работе, высказанные участниками семинара после доклада диссертанта, состояли в следующем:

1. В тексте диссертации на стр.30 сказано «Проблемой структурных исследований белков состоит в том, что из всех известных белковых молекул на сегодняшний день кристаллизовать удалось лишь 5%». Помимо

наличия грамматической ошибки следует отметить, что тот факт, что некоторые белки плохо кристаллизуются, не является проблемой структурных исследований в целом, это проблема исключительно рентгеноструктурного анализа, тогда как другие комплементарные методы – ЯМР, КриоЭМ позволяют получать структуры таких белков.

2. По тексту диссертации, например, на стр.31 говоря о белках – катализаторах определенных реакций, правильно употреблять термин «ферменты».
3. В тексте диссертации на стр.33 сказано, что белки нельзя наблюдать с помощью микроскопа. Это верно для оптического микроскопа, но с помощью криоэлектронной микроскопии в настоящее время получают структуры белков (что, кстати, отмечено в на следующей странице диссертации), практически не уступающие в уровне детализации данным, полученным методом рентгеноструктурного анализа.
4. В подписи к рисунку 14 указано «Кристалл белка в растворе». Указание на раствор тут излишне, т.к. вне раствора кристаллы чрезвычайно нестабильны. Скорее верным было бы указание на то, что кристалл находится в капилляре, т.к. это указывает на использованный метод кристаллизации.
5. В тексте диссертации на стр.34 сказано, что для проведения рентгеноструктурного анализа необходим размер кристалла порядка 100 мкм – это неверно, т.к. на современных источниках синхротронного излучения возможно получение дифракционных данных с гораздо меньших кристаллов (20-30 мкм и даже менее).
6. Использование английских заимствованных слов «преципитат», «протеин» выглядит странным в связи с наличием русских синонимов этих слов – «осадитель», «белок».
7. Рисунки 17-19 – неясно (не указано), что обозначено цветами на рисунке.



8. В тексте диссертации на стр.114 сказано, что кристаллы были получены в одной трети капель (с учетом одинаковых условий кристаллизации во всех каплях), но не дается объяснения этому, безусловно интересному, факту.
9. В тексте диссертации на стр.116 приведены аббревиатуры MV и PMGL2, не расшифрованные в тексте. Там же говорится об установлении пространственных групп выращенных кристаллов, хотя на самом деле речь идет о группах симметрии, не учитывающих наличие возможных винтовых осей.
10. В выводе №5 диссертации сказано, что использование разработанного МФУ из ПММА позволяет, в частности, «определять структуру кристаллизованного белка с пространственным разрешением лучше  $3\text{Å}$ , не извлекая кристалл из чипа». Указание на разрешение здесь выглядит излишним, т.к. предел дифракции кристалла определяется не только материалом МФА, но и природой самого кристалла. Также следует отметить, что получение полного дифракционного набора для кристаллов с низкой симметрией, например P1, в таком устройстве вызывает сомнение, т.к. рассеяние излучения материалом МФУ при прохождении луча вдоль чипа будет значительным, а возможность расшифровать структуру по наборам, собранным с нескольких кристаллов, в работе не продемонстрирована.
11. В тексте диссертации и автореферата встречаются грамматические ошибки и опечатки.


**По итогам обсуждения принято следующее заключение:**

Диссертационная работа Попова А.М. представляет собой оригинальное научное исследование, выполненное автором самостоятельно и на высоком научно-техническом и методическом уровне. Материалы диссертации

представлены в пяти публикациях в журналах, входящих в Перечень ВАК. Результаты диссертации докладывались на российских научных конференциях, защищены двумя ноу-хау и одним патентом на полезную модель. Автореферат диссертации и публикации достаточно полно отражают содержание работы, а выявленные незначительные недочеты никоим образом не умаляют значимость полученных результатов. Тема диссертации соответствует специальности 01.04.01 - Приборы и методы экспериментальной физики. Диссертационная работа Попова А.М. соответствует научному профилю Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН в части работ, связанных с кристаллизацией белков и их исследованию методами рентгеноструктурного анализа и малоуглового рентгеновского рассеяния, а также отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013, а ее автор Попов Антон Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики». По результатам голосования участников семинара единогласно было принято решение рекомендовать диссертацию к защите.

Отзыв на диссертацию подготовлен к.б.н., с.н.с Института биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН Бойко К.М., обсужден и утвержден на научном семинаре в ФИЦ Биотехнологии РАН от 24.01.2019.

**Старший научный сотрудник  
лаборатории инженерной энзимологии  
к.б.н.**



**Бойко К.М.**

**Ученый секретарь  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
к.б.н.**



**Орловский А.Ф.**