

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії**

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____Олександр БЕСАРАБ
“__” _____ 20__ р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою
«Регенеративна та біофармацевтична інженерія»
спеціальності 163 Біомедична інженерія
на тему: «Оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК
маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії»**

Виконав:

здобувач IV курсу, групи БФ-01

Голубєв Ілля Юрійович _____

Керівник:

доц. каф. ТМБ, д. б. н., с.н.с.,

Солдаткін Олександр Олексійович _____

Консультант з «Розробки схеми автоматизації»:

ст. викл. каф. ТПЗА,

Жураковський Ярослав Юрійович _____

Консультант з «Охорони праці та техніки безпеки»:

доц. каф. ОППЦБ, к. т. н.,

Демчук Гліб Вікторович _____

Рецензент:

д. мед. н., проф., проф. каф. ББЗЛ,

Гарнік Тетяна Петрівна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Відомість дипломного проєкту

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	К-сть листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Пояснювальна записка	79	
3	A1	БФ 0103. 23.30.002 ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	БФ 0103. 23.30.003 АС	Апаратурно-технологічна схема	1	
5	A1	БФ 0103. 23.30.004 СА	Схема автоматизації	1	

	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Голубєв І. Ю.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Солдаткін О. О.				1	1
Консульт.					КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ТМБ Гр. БФ-01	
Н/контр.						
Зав.каф.	Бесараб О.Б.					

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту**

на тему: «Оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК
маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії»

Київ – 2024

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної інженерії

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 163 Біомедична інженерія

Освітньо-професійна програма «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____Олександр БЕСАРАБ
«__»_____20__ р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Голубєву Іллі Юрійовичу

1. Тема проєкту «Оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії», керівник проєкту Солдаткін Олександр Олексійович, науковий ступінь, вчене звання, затверджені наказом по університету від «29» травня 2024 р. №2165-с
2. Термін подання студентом проєкту 12.06.2024
3. Вихідні дані до проєкту: відомості про біосенсорні системи для детектування ДНК маркерів.
4. Зміст пояснювальної записки: перелік скорочень, вступ, 4 розділи (медико-біологічна частина, технологічна частина, апаратурно-інженерна частина, охорона праці та техніка безпеки), висновки, перелік посилань, додатки.
5. Перелік графічного матеріалу: технологічна схема – 1 аркуш А1, апаратурна схема – 1 аркуш А1, схема автоматизації – 1 аркуш А1.
6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 3.2. Розробка схеми автоматизації	Жураковський Я. Ю., ст. викл. каф. ТПЗА	27.05.2024	05.06.2024
Розділ 4. Охорона праці та техніка безпеки	Демчук Г. В., доц. каф. ОППЦБ	27.05.2024	03.06.2024

7. Дата видачі завдання 27.05.2024

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1	Вступ. Медико-біологічна частина	02.06.2024	
2	Технологічна частина	03.06.2024	
3	Апаратурно-інженерна частина	05.06.2024	
4	Охорона праці та техніка безпеки	07.06.2024	
5	Креслення технологічної схеми	09.06.2024	
6	Креслення апаратурної схеми	10.06.2024	
7	Креслення схеми автоматизації	08.06.2024	
8	Оформлення пояснювальної записки	11.06.2024	

Здобувач

Ілля ГОЛУБЄВ

Керівник

Олександр СОЛДАТКІН

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт присвячено оптимізації біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії

Пояснювальна записка до дипломної роботи становить 72 сторінок та містить перелік умовних позначень, скорочень та термінів, вступ, 4 розділи, висновки, перелік посилань. В роботі наведено 18 рисунків, 17 таблиць, 40 посилань та 2 додатки.

Метою проєкту є оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії

Дана робота спрямована на дослідження та розробку методів оптимізації біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів.

Проаналізувавши літературні джерела було обрано найкращі хімічні середовища для зберігання наночастинок золота, які своїми властивостями покращують характеристики біосенсорної системи.

Було розроблено схему автоматизації окремих процесів оптимізації біосенсорної системи.

Актуальність оптимізації даної біосенсорної системи полягає у її великій перспективі та широких межах детектування різних захворювань.

Результат роботи може призвести до покращення детектування біосенсорної системи.

Ключові слова: біосенсорні системи, наночастинки золота, ДНК маркери, хронічна мієлоїдна лейкемія, детектування хронічних захворювань.

ABSTRACT

The diploma project is dedicated to the optimization of a biosensor system for detecting DNA markers of chronic myeloid leukemia. The explanatory note for the diploma work comprises 72 pages and includes a list of symbols, abbreviations, and terms, an introduction, 4 chapters, conclusions, and a list of references. The work contains 18 figures, 17 tables, 40 references, and 2 appendices.

The aim of the project is to optimize the biosensor system for detecting DNA markers of chronic myeloid leukemia. This work is focused on the research and development of methods for optimizing the biosensor system for DNA marker detection.

After analyzing the literature sources, the best chemical environments for storing gold nanoparticles were selected, which improve the characteristics of the biosensor system due to their properties. A scheme for automating individual processes of the biosensor system optimization was developed.

The relevance of optimizing this biosensor system lies in its great potential and wide range of detection capabilities for various diseases. The result of this work can lead to improved detection capabilities of the biosensor system.

Keywords: biosensor systems, gold nanoparticles, DNA markers, chronic myeloid leukemia, detection of chronic diseases.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ	9
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1 МЕДИКО-БІОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	12
1.1 Медико-біологічне обґрунтування	12
1.1.1 Загальна характеристика гібридизаційних ДНК біосенсорів	12
1.1.2 Біосенсиори на основі ППР	13
1.1.3 Наночастинки золота в біотехнологіях	14
1.1.4 Рання діагностика ХМЛ.....	17
1.1.5 Ген BCR-ABL	20
1.2 Характеристика готового біомедичного продукту	21
1.3 Біологічні основи отримання біомедичного продукту	23
Висновки до розділу 1	24
РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	25
2.1 Обґрунтування вибору технології виготовлення	25
2.2 Опис технологічного процесу	33
2.3 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів	40
2.4. Матеріальний баланс	42
2.5 Контроль процесу виготовлення.....	43
2.6 Стандартизація біомедичної продукції	46
Висновки до розділу 2	47

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Зміст		
Розроб.		Голубев І. Ю.					
Перевір.		Солдаткін О.О.					
Реценз.							
Н. Контр.		Солдаткін О. О.					
Затверд.		Бесараб О. Б.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						6	
					НТУУ КПІ ім. Ігоря Сікорського		

РОЗДІЛ 3 АПАРАТУРНО-ІНЖЕНЕРНА ЧАСТИНА.....	48
3.1 Обґрунтування конструкції технологічного устаткування	48
3.2 Розробка схеми автоматизації лабораторної установки	50
3.2.1 Опис розробленої схеми автоматизації.....	51
Висновки до розділу 3	52
РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ	54
4.1 Характеристика виробничого приміщення.....	54
4.2 Аналіз потенційних небезпек та заходи їх усунення	58
4.2.1 Небезпека ураження електричним струмом.....	58
4.2.2 Пожежна небезпека	59
4.2.3 Небезпека при роботі з рухомими механізмами	61
Висновки до розділу 4	62
ВИСНОВКИ.....	64
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	66
ДОДАТКИ.....	72

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

НЧЗ – Наночастинки золота;

ППР – Поверхневий плазмонний резонанс;

ХМЛ – Хронічна мієлогенна лейкемія;

SSC – Sodium saline citrate;

MCH – Меркаптогексанол;

LA – Ліпоєва кислота.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						9
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВСТУП

Актуальність

Рання діагностика генетичних захворювань надає можливість для своєчасного їх лікування або недопущення загострення хвороби. Наразі основними вимогами до відповідних діагностичних технік є точність та дешевизна реагентів і матеріалів, що залучаються для вимірювання. До найпоширеніших методів, що застосовуються в таких випадках, належать методи з використанням геномних зондів, диференційного забарвлення хромосом, флуоресцентної гібридизації *in situ*, полімеразної ланцюгової реакції, тощо.

Хронічна мієлоїдна лейкемія спричиняється реципрокною транслокацією між 9 й 22 хромосомами, яка призводить до утворення фузійного гена BCR-ABL та відповідного онкобілка, який і є головним чинником розвитку захворювання. Метод спектрометрії поверхневого плазмонного резонансу дає можливість детектувати цільові біомакромолекули в реальному часі шляхом реєстрації змін діелектричних показників тонкого шару досліджуваного середовища, що прилягає до чутливої поверхні сенсорного чіпа, де іммобілізовані одноланцюгові ДНК-зонди. Формування нанорозмірного квазі-моношару зондових олігонуклеотидів на сенсорній поверхні та наступна їх гібридизація з цільовими комплементарними послідовностями (ДНК-мішенями) наявними у досліджуваному зразку, викликає відгук біосенсора.

Таким чином, оптимізація біосенсорних систем на основі ДНК має величезний потенціал для поліпшення діагностики та моніторингу захворювань, що в свою чергу сприяє збереженню здоров'я населення та підвищенню якості життя.

Мета роботи: оптимізувати гібридизаційні ДНК біосенсиори для детектування ДНК маркерів шляхом застосування наноматеріалів.

Завдання:

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1. Проаналізувати літературні джерела про гібридизаційні ДНК біосенсиори та їхні характеристики.

2. Побудувати калібрувальну криву для залежності оптичної густини від концентрації досліджуваних наночастинок золота.

3. Дослідити стабільність НЧЗ, модифікованих тіольованими олігонуклеотидами та блокувальними молекулами, в різних хімічних середовищах та кількість піпетувань, необхідних для повного ресуспендування НЧЗ після їх осадження шляхом центрифугування.

4. Оцінити рівні неспецифічного та специфічного відгуку гібридизаційного ДНК-біосенсора на модифіковані НЧЗ.

5. Скласти та описати технологічну схему отримання біологічного продукту для оптимізації гібридизаційних ДНК біосенсорів.

6. Розробити та описати апаратурну схему й схему автоматизації стадій модифікування наночастинок золота.

7. Виявити потенційні небезпеки, які можуть виникнути при роботі з наночастинок золота, та розробити заходи запобігання небезпек для забезпечення безпеки працівників.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						11
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1 МЕДИКО-БІОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

1.1 Медико-біологічне обґрунтування

1.1.1 Загальна характеристика гібридизаційних ДНК біосенсорів

Біосенсор - це аналітичний прилад, що містить в своєму складі біологічний чутливий елемент (фермент, антитіло, ДНК, клітинні органели, клітини), поєднаний з перетворювачем (електрохімічним, оптичним, калориметричним чи акустичним). Вимірювання концентрації мішені аналізатор виконує кількісним перетворенням параметрів реакції у кількісний електричний чи оптичний сигнал [1].

Принцип роботи гібридизаційних ДНК-біосенсорів полягає в гібридизації відомої послідовності ДНК ланцюга, тобто зонда, з невідомим комплементарним ланцюгом (мішенню) [2]. ДНК-зонди можуть бути отримані хімічними методами або методами молекулярної біології; у цьому випадку зонд може бути отриманий шляхом зворотної транскрипції попередньо виділеної та специфічної інформаційної РНК або шляхом визначення її нуклеотидної послідовності на основі амінокислотної послідовності білка, що експресується цією ДНК [3].

Останніми роками біосенсиори на основі ДНК продемонстрували прорив, як кандидати наступного покоління біомедичних діагностичних пристроїв. Порівняно зі звичайними тест-системами, біосенсиори на основі ДНК мають такі переваги, низька границя визначення, більш довготривалий термін служби та менша вартість виробництва [4].

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						12
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.1.2 Біосенсори на основі ППР

Швидке та точне виявлення генетичних захворювань може підвищити ефективність лікування, що призведе до вищої ймовірності оптимістичного прогнозу для пацієнта. Стандартною технікою, що використовується в клінічній діагностиці таких захворювань, є ПЛР у реальному часі [5]. Перевагами методів, заснованих на ПЛР, є точність та велика пропускна здатність, а недоліком є висока вартість обслуговування. У цьому контексті однією з найперспективніших стратегій діагностики є поверхневий плазмонний резонанс або ППР [6].

Принцип детекції ППР полягає в тому, що частина енергії променя світла, що падає на тонкий шар металу, який знаходиться між двома діелектриками (скляною призмою та досліджуваною рідиною або газом), може поглинатися делокалізованими електронами в металевій плівці (поверхнева хвиля-плазмон), таким чином зменшуючи інтенсивність відбитого світла. У випадку, коли горизонтальний вектор такої хвилі та променя світла співпадають, вони вступають в резонанс, результатом якого є повне поглинання енергії падаючого світла електронами металу (рис. 1.1).

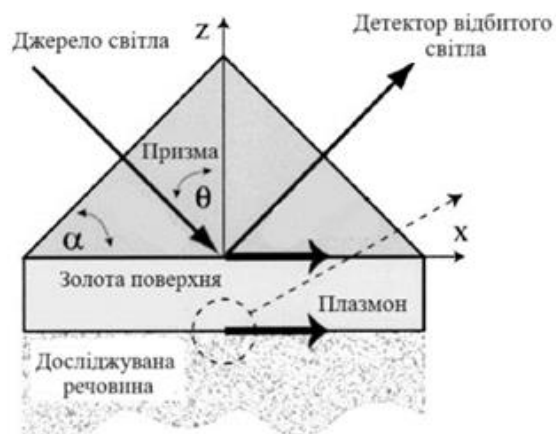


Рисунок 1.1 – Схематичне зображення призми ППР-сенсора [7]

Кут падіння світла, при якому спостерігається ППР, є надзвичайно чутливим до діелектричної проникності прилеглого середовища в тонкому шарі поблизу межі поділу. Висока чутливість, яку демонструє ефект ППР, зараз широко використовується в біологічному та хімічному зондуванні [8]. З

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						13
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використанням біомолекули або рецептора, ковалентно іммобілізованого на поверхні металу, зміна параметрів ППР може відображати варіації товщини чутливого шару, які обумовлені селективними взаємодіями між зондовою біомолекулою та її аналітом в водному розчині [7]. Зміни куту нахилу, довжини хвиль, фазових характеристик світла, всі ці характеристики надають можливість моніторингу біомолекулярних взаємодій у режимі реального часу. Більшість відомих систем на основі ППР працюють з видимим світлом і мають глибину зондування 200–300 нм, тобто товщину шару в межах чутливої реакції [9].

Типовими металами, які підтримують поверхневі плазмони, є срібло та золото, але також використовувалися інші, такі як мідь, титан і хром [10].

В літературі є відомості стосовно успішного застосування ППР біосенсорів. Наприклад, було продемонстровано, що метод ППР є успішним високопродуктивним інструментом виявлення маркерів у клінічних зразках для ранньої діагностики раку [11]. ППР-біосенсиори мають ряд переваг над звичайними методами виявлення генетичних захворювань, включаючи детектування в режимі реального часу без використання міток і з більш високою чутливістю. ППР-біосенсиори вже використовуються для виявлення антитіл, білків, терапевтичних засобів, вірусів і нуклеїнових кислот у зразках хворих на рак [12].

1.1.3 Наночастинки золота в біотехнологіях

Наночастинки золота – одні з найстабільніших наноматеріалів. Порівняно з іншими наноматеріалами, НЧЗ виявляють багато різних фізичних та хімічних властивостей. Унікальні фізичні властивості наночастинок золота в основному пов'язані з ефектом квантового розміру, коли розмір наночастинок становить близько 20 нм. Такі наноструктури демонструють магнітні, оптичні, акустичні, теплові та електричні властивості, що значно відрізняються від властивостей відповідних макроскопічних матеріалів [13].

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Завдяки цим унікальним фізичним характеристикам і чудовій біосумісності наночастинки золота мають великий потенціал у біомедичних сферах, таких як доставка ліків, біологічна візуалізація, фототермічна терапія та клінічна діагностика [14]. Наприклад, їх можна поєднувати з ДНК або білками через електростатичну взаємодію. Завдяки своїм магнітним властивостям у нанометровому масштабі НЧЗ можуть досягати цільової доставки біомолекул під контролем зовнішнього магнітного поля [15, 16].

Крім того, велика питома поверхня наночастинок золота може спричинити локальний резонанс вільних електронів у них і демонструвати унікальний ефект локального поверхневого плазмонного резонансу (ЛППР) [17]. Поверхневі плазмони можна збуджувати електронами або світловими хвилями, посилюючи периферійне випромінювання флуоресценції та виробляючи перетворення світла в тепло, тим самим значно покращуючи ефективність поглинання світла, завдяки чому наночастинки золота мають здатність до фототермічного перетворення [18].

З огляду на вищеперераховані переваги НЧЗ, вони є перспективними наноматеріалами в тому числі для посилення сигналу ППР-біосенсорів, зокрема гібридизаційних ДНК-біосенсорів. Шляхом утворення на чутливій поверхні сенсора сендвіч-подібної структури, що складається з ДНК-зонда, ДНК-мішені та іншого ДНК-зонда, іммобілізованого на поверхні НЧЗ, можна досягнути детекції ДНК мішеней у значно менших концентраціях, аніж у звичайних ППР-біосенсорах (рис. 1.2).

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						15
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

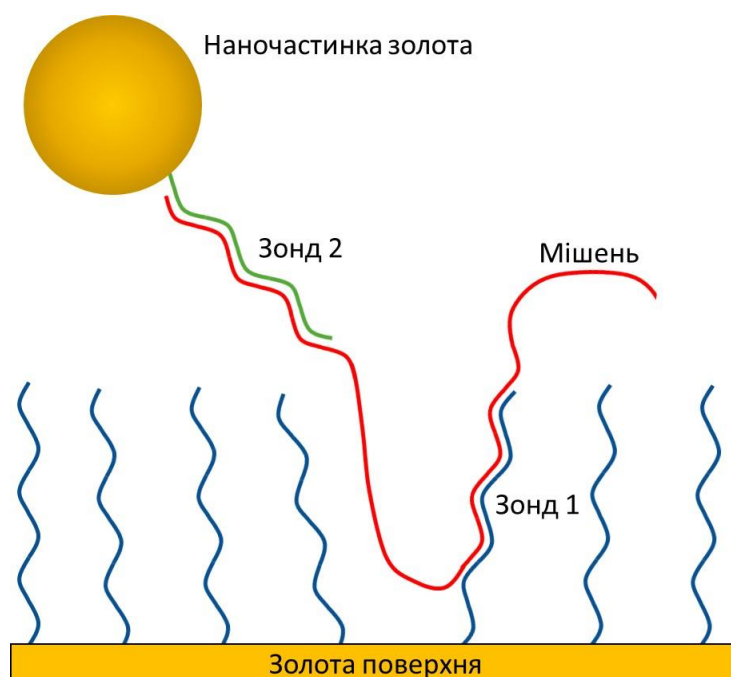


Рисунок 1.2 – Схематичне зображення сендвіч-подібної структури.

З іншої сторони, буферні розчини, які мають високу іонну силу, яка прискорює процеси гібридизації ДНК, можуть призводити до неспецифічної реакції НЧЗ, а саме агрегації на поверхні сенсора через недостатнє електростатичне відштовхування між окремими наночастинками, що негативно впливає на ефективність біосенсора [19]. Такий вплив колоїдної стабільності наночастинок золота на гібридизаційні ДНК біосенсиори викликаний двома факторами. Перший з них полягає в тому, що неконтрольоване накопичення НЧЗ на поверхні золота змінює оптичні властивості такої поверхні і тягне за собою непередбачувані зміни резонансного кута поверхні плазмону, що виражається у значному збільшенні неспецифічної відповіді датчика ППР. Другий фактор полягає в небажаній функціоналізації золотої поверхні біосенсора молекулами, які іммобілізовані на поверхні осаджених НЧЗ, що може значно погіршити стан селективності і межі виявлення ППР біосенсора під час наступних вимірювань. Відповідно, мінімізація агрегації НЧЗ в буферах з високою іонною силою є необхідною для успішного використання наночастинок золота в ППР біосенсорах [20].

Проведені дослідження показують, що адсорбція ДНК-олігонуклеотидів на НЧЗ протидіє агрегації наночастинок золота шляхом збільшення

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

негативного заряду їхньої поверхні і створення додаткових стеричних перешкод [21]. Також методи покращення колоїдної стабільності НЧЗ передбачають використання коротких блокуючих молекул, таких як 6-меркапто-1-гексанол і/або ліпоева кислота. Ці молекули здатні утворювати ковалентні зв'язки з НЧЗ за рахунок власних тіольних груп. Використання цих молекул може не тільки сповільнити процеси агрегації НЧЗ у буферах з високою іонною силою, але також запобігати зв'язуванню ДНК із золотом через азотисті основи, що позитивно вплине на ефективність гібридизації молекул ДНК у біосенсорній системі.

1.1.4 Рання діагностика ХМЛ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це клональне мієлопроліферативне захворювання, що характеризується походженням усього лейкемічного клону з однієї непластично трансформованої стовбурової клітини [22], причиною якої є поява в кровотворній клітині реципрокної транслокації між хромосомами 9 та 22, $t(9;22)(q34;q11)$ [23] (рис. 1.3). Ця транслокація призводить до утворення філадельфійської (Ph) хромосоми, яка містить химерний онкоген BCR-ABL, що кодує онкобілок BCR-ABL-тирозинкіназу [22]. Терапія пацієнтів з ХМЛ з фузійним геном BCR-ABL полягає у блокуванні механізму автофосфорилювання за допомогою інгібіторів тирозинкінази (ТКІ), наприклад, іматиніб [23].

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

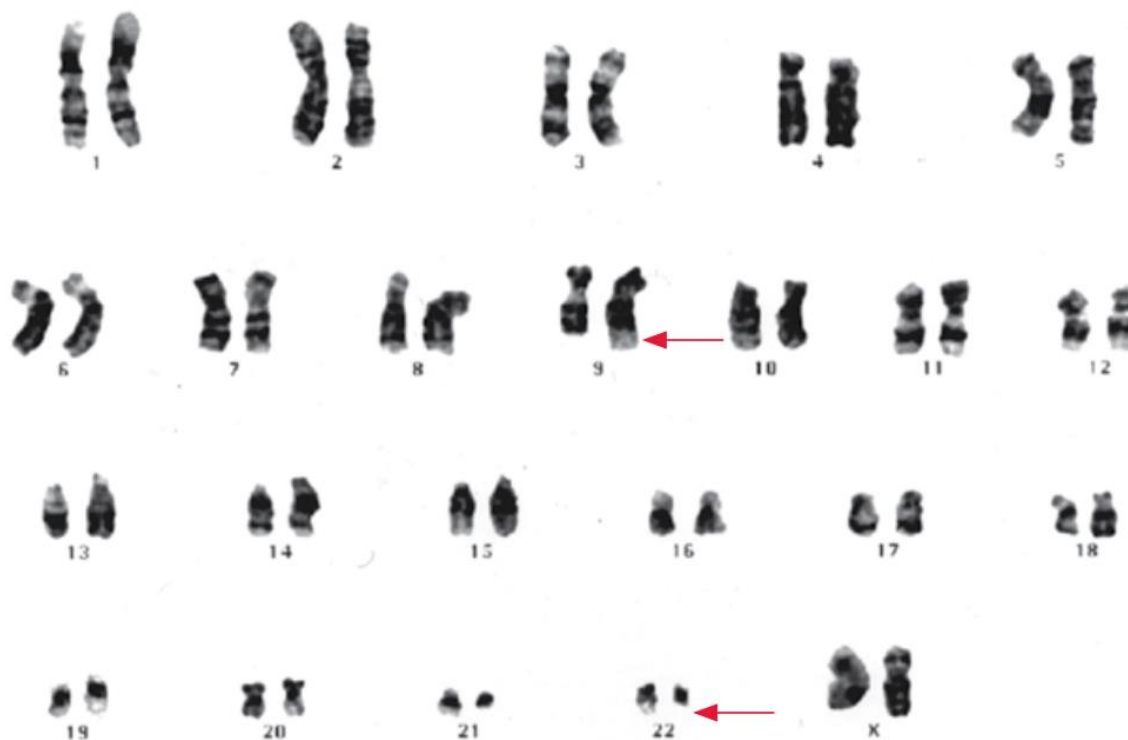


Рисунок 1.3 – набір хромосом з мозкової клітини пацієнтки з ХМЛ.

Чим вищий номер хромосоми, тим вона менша. Стрілка на четвертому рядку вказує на скорочене плече хромосоми 22 (Ph-хромосома), характерна для лейкемічних клітин мозку пацієнтів з ХМЛ. Стрілка на другому рядку вказує на хромосому 9, яка витягнута. Ці дві зміни відображають транслокацію хромосомного матеріалу між хромосомами 9 та 22 [24]

Більшість випадків ХМЛ виникають у дорослих. З 2007 по 2011 рік медіанний вік при діагностиці ХМЛ становив 64 роки. У невеликої кількості дітей також розвивається ХМЛ, перебіг хвороби у дітей і дорослих подібний. Частота ХМЛ зростає з віком, приблизно від менш ніж 1,2 на 100 000 осіб приблизно до 40 років, приблизно до 2,4 на 100 000 осіб у віці 55 років і приблизно до 9,6 на 100 000 осіб у віці 80 років і старше [24].

У своїй еволюції ХМЛ проходить дві фази: хронічну та термінальну (бластна криза). Крім того, важливо виділити між ними перехідну фазу, яка називається акцелерація (прискорена фаза). На цьому етапі хвороба може перейти в термінальну фазу або під впливом лікування в хронічну, у зв'язку з чим особливе значення набуває адекватна діагностика і методи лікування [25].

На відміну від інших форм лейкемії, ХМЛ є повільно прогресуючим захворюванням і не повністю перешкоджає розвитку еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів. Тому пацієнти можуть мати ХМЛ, але не мати симптомів, наприклад, люди з хронічною фазою ХМЛ.

Як сказано вище, люди з хронічною фазою ХМЛ можуть взагалі не мати симптомів, проте вони мають збільшену кількість лейкоцитів. Після лікування симптоми швидко зникають, кількість лейкоцитів повертається до нормальних рівнів, селезінка зменшується, концентрація гемоглобіну покращується, загальний стан пацієнта відновлюється, і він може продовжувати звичайні активності.

У прискореній фазі (акцелерації) кількість бластних клітин у периферичній крові та/або кісткового мозку вище норми, підвищена кількість лейкоцитів через накопичення бластних клітин, знижена кількість тромбоцитів, можуть з'явитися нові хромосомні зміни (мутації), розвинутися/загостритися анемія та інші ускладнення.

У термінальній фазі кількість бластних клітин у крові та у кістковому мозку вище норми, внаслідок чого знижується кількість еритроцитів, тромбоцитів, нейтрофілів, спостерігається поширення бластних клітин в інших тканинах, а також виникають симптоми втомленості, задишки, болю у животі та кістках, збільшення селезінки, кровотечі, інфекції, блідість (через анемію), нічну пітливість та нездатність переносити високі температури.

Для діагностики ХМЛ використовують різні тести для аналізу крові та мозкових клітин. Аналіз крові визначає кількість та типи клітин у крові, зазвичай виявляються зменшення гемоглобіну, збільшення білих кров'яних клітин (часто дуже високих рівнів) і можливі зміни кількості тромбоцитів. Мікроскопічне дослідження крові показує специфічний зразок білих кров'яних клітин, наявність незрілих клітин (лейкемічних бластних клітин та промієлоцитів) та зрілих клітин (мієлоцитів та нейтрофілів), які зазвичай відсутні у здорових осіб [24].

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						19
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.1.5 Ген BCR-ABL

Як зазначено у підрозділі вище, основна молекулярна особливість ХМЛ полягає у наявності філадельфійської хромосоми (Ph) (рис. 1.4), яка утворюється в результаті реципрокної транслокації між 9-ю та 22-ю хромосомами, яка породжує ген BCR-ABL [23], що кодує онкобілок BCR-ABL-тирозинкіназу. Цей онкобілок може фосфорилювати білки, що беруть участь у багатьох клітинних процесах. У клітинах лейкомічного клону ця трансформація забезпечує переважання процесів проліферації над диференціюванням, що порушує нормальну ієрархію клітин. З часом, бластні клітини лейкомічного клону стають домінуючими і витісняють пул нормальних гемопоетичних клітин [22].

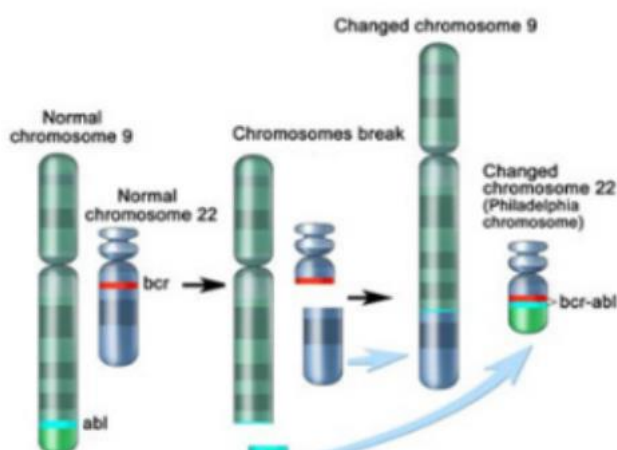


Рисунок 1.4 – Філадельфійська хромосома [23]

Фузійний ген BCR-ABL має різні типи транскрипції, залежно від положення точки розриву у гені BCR, яка об'єднується з геном ABL. Загалом, фузійний ген BCR-ABL класифікується за 3 областями розриву гена BCR: major (M-bcr), minor (m-bcr) та micro (μ-bcr) (рис. 1.5).

Major breakpoint має 2 підтипи: b2a2 (e13a2) та b3a2 (e14a2). Тип b2a2 (e13a2) формується, якщо ген BCR перерваний в екзоні 13 (b2), а його фрагмент транслокується з геном ABL у екзоні 2 (a2). Тип b3a2 (e14a2) є поєднанням фрагмента гена BCR, в якому точка розриву знаходиться у 14 екзоні (також називається b3), з фрагментом гена ABL, який перерваний в

екзоні 2 (a2). Minor breakpoint формує тип e1a2, який є поєднанням фрагмента гена BCR, зламаного у екзоні 1, з фрагментом гена ABL, що зламаний у екзоні 2 (a2). Micro breakpoint формує тип e19a2 (c3a2). Він формується, коли фрагмент гена BCR з розривом у третій основній області (major, minor і micro) кодує різні розміри білка, але всі вони мають високу активність тирозинкінази.

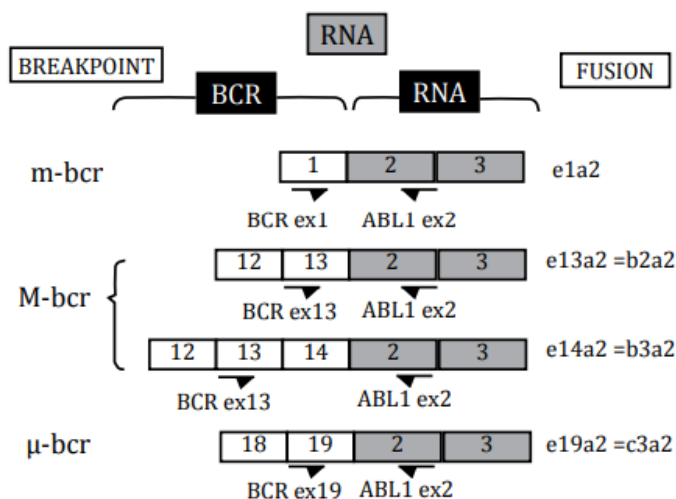


Рисунок 1.5 – Структури типів транскрипції BCR-ABL

Major breakpoint тип кодує білок з молекулярною масою 210-кДа (p210), minor тип кодує білок – з масою 190-кДа (p190), а тип micro breakpoint кодує білок 230-кДа (p230). Багато досліджень у різних країнах показали, що 95% пацієнтів із ХМЛ, які пройшли позитивне тестування на ген BCR-ABL, мають тип major breakpoint з перебудовою e13a2 (b2a2) або e14a2 (b3a2) [23].

1.2 Характеристика готового біомедичного продукту

Результатом виробництва є модифіковані наночастинки золота із покращеною стабільністю, що дає можливість працювати з ними у буферних розчинах. Отримані НЧЗ являють собою рожеву рідину без включень (рис. 1.6).



Рисунок 1.6 – Зображення готового продукту

Готовий продукт потрібно зберігати при особливих умовах в спеціальному контейнері для зберігання та транспортування. Наночастинкам золота слід уникати прямого попадання сонячного світла та зберігати їх при температурі 4 °С.

Модифіковані наночастинки золота повинні мати такі характеристики:

- Співвідношення оптичної густини на хвилях 520 нм та 650 нм має бути $\geq 20/1$ відповідно.
- Відсутність осаду на дні або стінках ємності з модифікованими НЧЗ (рис 1.7);
- Відсутність колоїдних агрегатів наночастинок золота (рис 1.7);

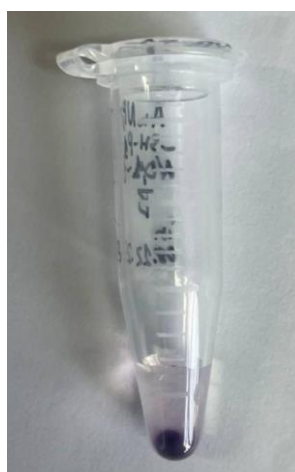


Рисунок 1.7 – Колоїдний агрегат наночастинок золота

- Збереження стабільності (або рожевого кольору) у середовищі 2xSSC (рис 1.8)

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

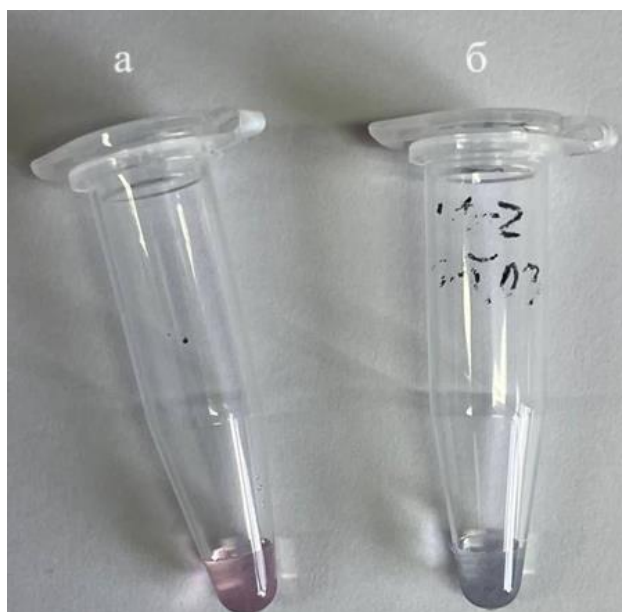


Рисунок 1.8 – Модифіковані НЧЗ у середовищі 2xSSC (а) стабільні
(б) агреговані

1.3 Біологічні основи отримання біомедичного продукту

Модифіковані наночастинки золота є основним об'єктом покращення характеристик гібридизаційного ДНК біосенсора. Їхнє технологічне виготовлення можна описати наступним чином.

Метод ковалентного зв'язування тіолових олігонуклеотидів використовується для прив'язування ДНК до золотої поверхні, завдяки високій афінності тіолових груп до атомів благородних металів, що забезпечує утворення стійкого ковалентного зв'язку [26].

Зазвичай, одноланцюгові олігонуклеотиди з'єднуються з поверхнею золота шляхом взаємодії їхніх нуклеотидів з атомами золота, що створює кілька точок контакту з поверхнею НЧЗ. Однак при великій кількості таких контактів чутливість біосенсора значно знижується. Тому необхідно блокування вільної поверхні золота. Це досягється шляхом іммобілізації молекул меркаптогексанола на поверхні золота. Таким чином, область небажаного зв'язування ДНК зондів блокується, крім того коротка довжина молекул меркаптогексанола не утворює стеричну перешкоду під час

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						23
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

подальшої гібридизації [27]. Згідно з результатами досліджень щодо колоїдної стабільності наночастинок у водних розчинах різних тіольованих молекул, припускається, що взаємодія їх поверхні з меркаптогексанолам не призводить до повного усунення агрегації [28].

Отже, додатково використовують ліпоєву кислоту, як стабілізатор разом з меркаптогексанолам, оскільки ця сполука має негативний заряд і також може утворювати ковалентні зв'язки з золотом.

Таким чином, модифікація наночастинок золота відбувається шляхом інкубації НЧЗ з олігонуклеотидами, меркаптогексанолам та ліпоєвою кислотою. Після інкубації модифіковані НЧЗ відділяють від незв'язаних тіольованих молекул центрифугуванням [20].

Висновки до розділу 1

У цьому розділі було детально досліджено біологічні, хімічні та фізичні основи гібридизаційних ДНК біосенсорів та наночастинок золота. Також проведена оцінка характеристик модифікованих наночастинок золота в різних умовах.

Було розглянуто хронічну мілоєдну лейкемію та її ранню діагностику, ген BCR-ABL та зміни в гені, які викликають ХМЛ. Було розглянуто характеристики готового біомедичного продукту та способи його отримання.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

2.1 Обґрунтування вибору технології виготовлення

Апаратурно-технологічна схема виробництва зображає виконання основного процесу оптимізації біосенсору на основі ДНК на основі ЛСК: ТП 7 – ТП 8, а саме процеси модифікації наночастинок золота [35, 36].

Персонал вручну виконує основні операції технологічного процесу, такі як дозування речовин, ресуспендування, перенесення зразків між технологічними об'єктами та контроль якості продукції. Ці операції потребують стерильних умов для запобігання забруднення зразків і забезпечення того, щоб вони не потрапили на відкриті ділянки шкіри працівників. З цією метою на виробництві передбачена робота в рукавичках та халатах.

Середній діаметр модифікованих наночастинок золота має бути 10-19 нм. Використання НЧЗ такого розміру продиктоване двома чинниками: з одного боку, результатом синтезу НЧЗ з середнім діаметром від 20 нм за методом Туркевича є висока полідисперсність таких наночастинок [29]. З іншого боку, препарати НЧЗ з середнім діаметром менше 10 нм включають у себе фракції наночастинок діаметром до 4 нм, яким притаманні цитотоксичні та генотоксичні властивості [30]. На графіку нижче представлений розподіл НЧЗ у відсотковій кількості, отриманий методом динамічного світлорозсіювання за допомогою системи фотонної кореляційної спектроскопії серії Malvern Zetasizer Nano (рис. 2.1). Такий діаметр зумовлений технологією синтезу НЧЗ. Синтез відбувається за допомогою редукції іонів тетрахлороаурату (AuCl_4^-) шляхом кип'ятіння у водному розчині натрію цитрату. Результатом цього процесу є формування практично монодисперсних сферичних структур наночастинок золота. Таким чином,

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						25
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

взаємодія між іонами цитрату та атомами золота запобігає подальшому приєднанню атомів золота та збільшенню частинок [20].

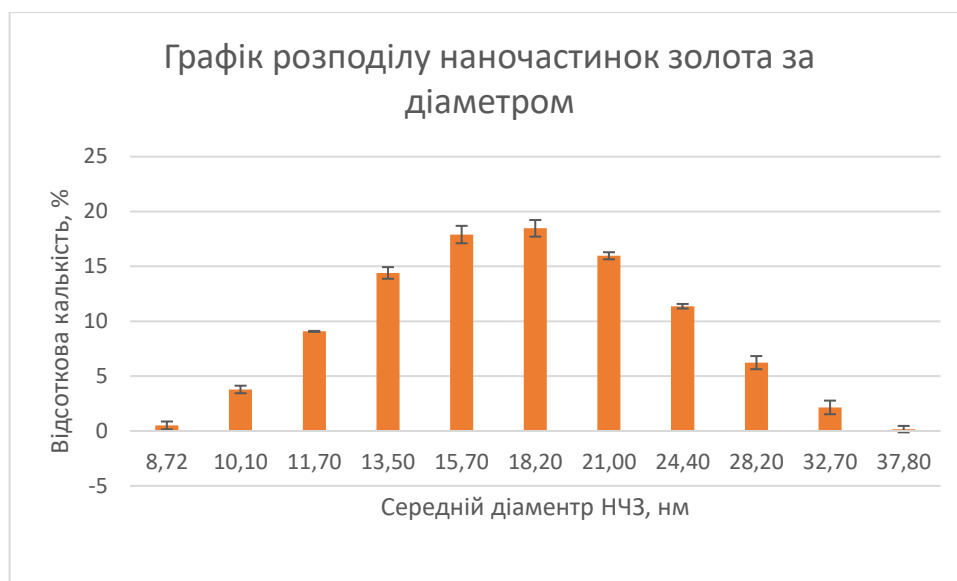


Рисунок 2.1 – Графік розподілу модифікованих наночастинок золота

Відомо, що монодисперсні НЧЗ мають найбільшу оптичну густину при довжині хвилі 520 нм, тобто поглинають світло в червоному спектрі [29]. В свою чергу агреговані наночастинок золота мають меншу оптичну густину при довжині хвилі 520 нм та більшу при 650 нм, що свідчить про їхню агрегацію та здобуття синього кольору (рис. 2.2).

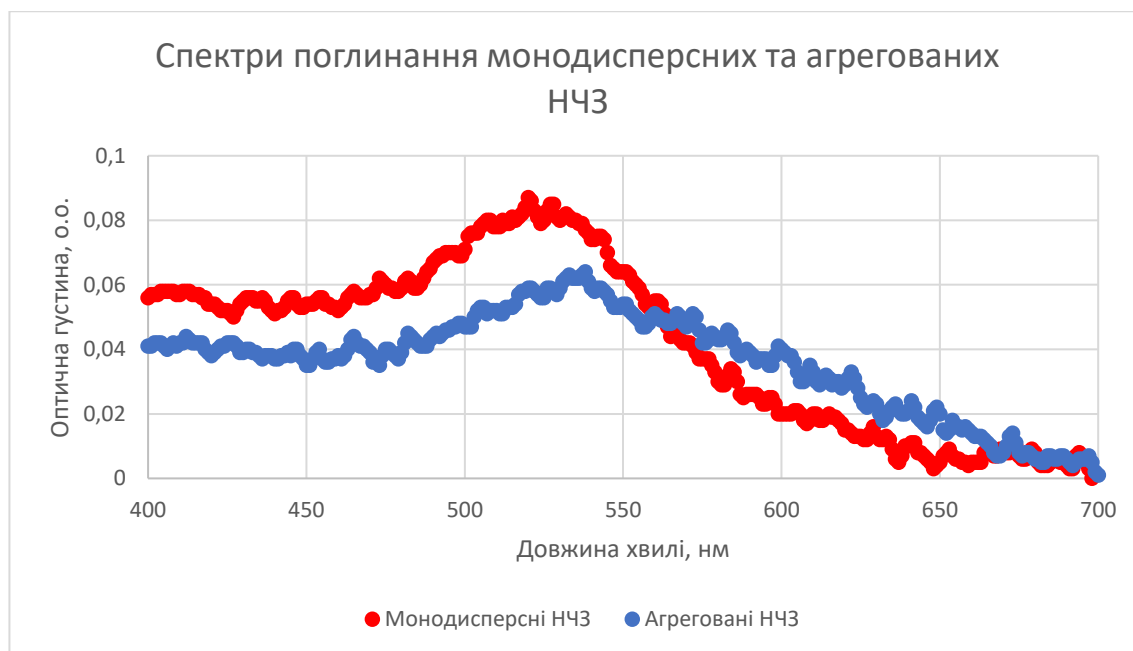


Рисунок 2.2 – Спектри монодисперсних та агрегованих НЧЗ

Отже, однією з найважливіших характеристик кінцевих НЧЗ, якої слід дотримуватися є співвідношення оптичної густини на хвилях 520 нм та 650 нм і воно має бути $\geq 20/1$ відповідно. Таке співвідношення було виявлено в ряді дослідів з вибіркою модифікованих наночастинок золота різної концентрації. За калібрувальною кривою можна побачити, що між оптичною густиною та концентрацією є лінійна залежність. Також, при збільшенні концентрації НЧЗ росте співвідношення оптичної густини на хвилях 520 нм та 650 нм (рис 2.3). З цих даних згідно з законом Бугера-Ламберта-Бера можна обчислити коефіцієнт молярної екстинкції відповідних НЧЗ, який надалі використовуватиметься для контролю концентрації наночастинок у досліджуваних препаратах.

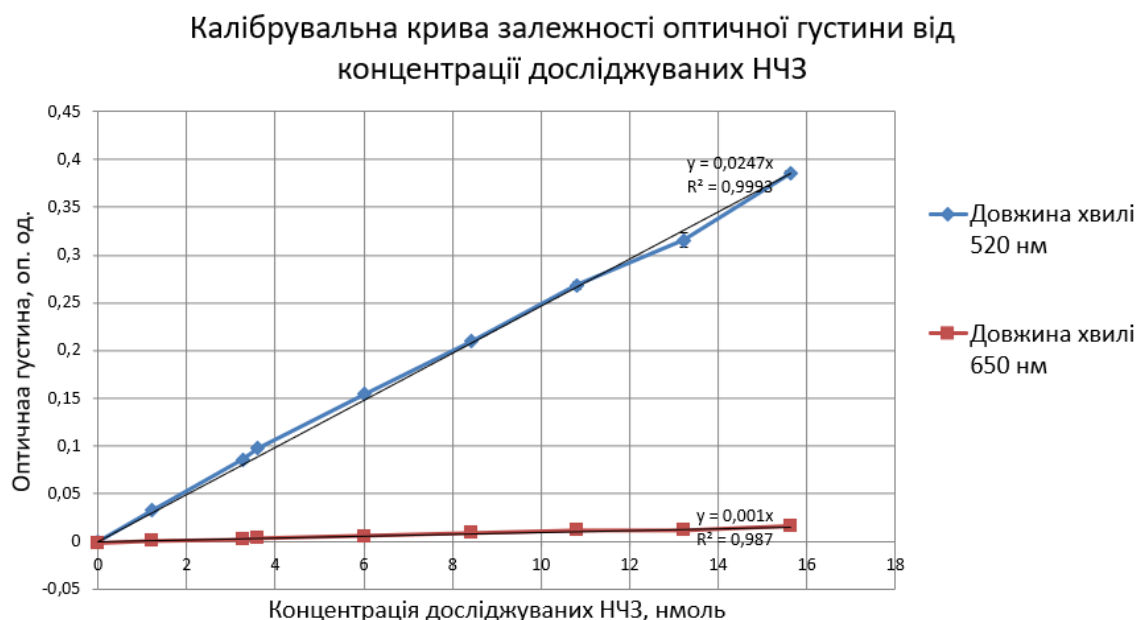


Рисунок 2.3 – Калібрувальна крива залежності оптичної густини від концентрації досліджуваних НЧЗ

Наступним технологічним процесом є модифікація наночастинок золота, а саме іммобілізація олігонуклеотидів-зондів, послідовність яких відповідає перебудові e13a2 фузійного гена BCR-ABL, на їхній поверхні. Для цього беруть певну концентрацію НЧЗ у формі золю, до якої додають буферний розчин та олігонуклеотиди в потрібній кількості. При відбиранні та внесенні аліквот необхідно точно дотримуватися заданого об'єму. Для цього використовують піпеткові дозатори різних об'ємів. З урахуванням

доступності, зручності в експлуатації та точності були обрані дозатори від IKA-Werke різних об'ємів.

Для того, щоб тіольовані олігонуклеотиди вдало зв'язалися з наночастинками золота їх потрібно поставити на інкубацію протягом 12 годин при температурі 22 °C [31]. Інкубатор від Lmb Technologie зможе забезпечити необхідні умови, він дає можливість високоточного регулювання температури повітря, рівномірний розподіл тепла та низьке споживання енергії. Методика передбачає вторинне інкубування з додаванням стабілізуючих агентів для утворення більш стійких зв'язків. Інкубування проходить одну годину при температурі в 22 °C.

Повні результати дослідження впливу концентрації стабілізуючих агентів при модифікації AuNPs на неспецифічний відгук ППР-біосенсора наведено на рисунку 2.4. Експерименти проводили з некомплементарними олігонуклеотидами, щоб легше було виділити неспецифічну сорбцію наночастинок на поверхні сенсорної пластини. Виходячи з отриманих результатів, для подальшої гібридизації в середовищі 2×SSC були обрані AuNPs, функціоналізовані в розчині 0,75 мкМ тіольованого олігонуклеотида, 2 мкМ MCH, 2 мкМ LA та 0.1×SSC.

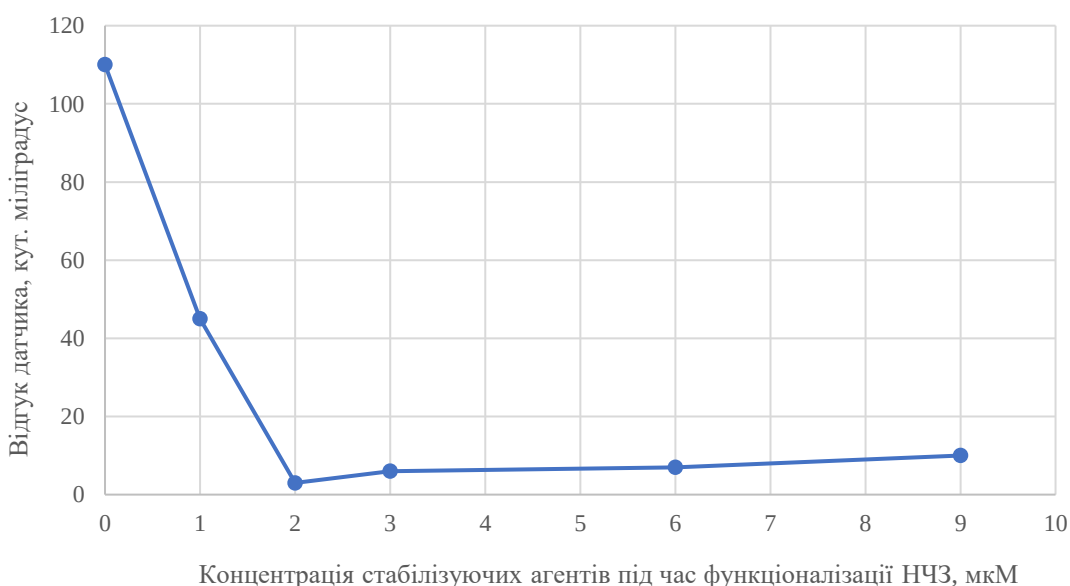


Рисунок 2.4 – Залежність неспецифічного сенсорного відгуку ППР при введенні AuNPs, функціоналізованих некомплементарними

тіольованими олігонуклеотидами від концентрації стабілізуючих молекул: 6-меркапто-1-гексанолу та ліпоєвої кислоти в різних концентраціях.

З метою підбору найкращого середовища для довгострокового зберігання модифікованих наночастинок золота, було проведено ряд експериментів. Суть експериментів полягала у стимулюванні агрегації НЧЗ шляхом зменшення відстані між ними за рахунок послідовних центрифугувань. Після кожного такого центрифугування препарат НЧЗ був ресуспендований з подальшим вимірюванням його оптичної густини. Його концентрація, розрахована за законом Бугера-Ламберта-Бера, порівнювалась із початковою концентрацією, після чого робився висновок про кількість НЧЗ, що пройшли незворотну агрегацію та не піддалися центрифугуванню. Для експериментів були обрані чотири буферні середовища: деіонізована вода, 0.1xSSC, 0.2xSSC та 2xSSC (рис. 2.5).

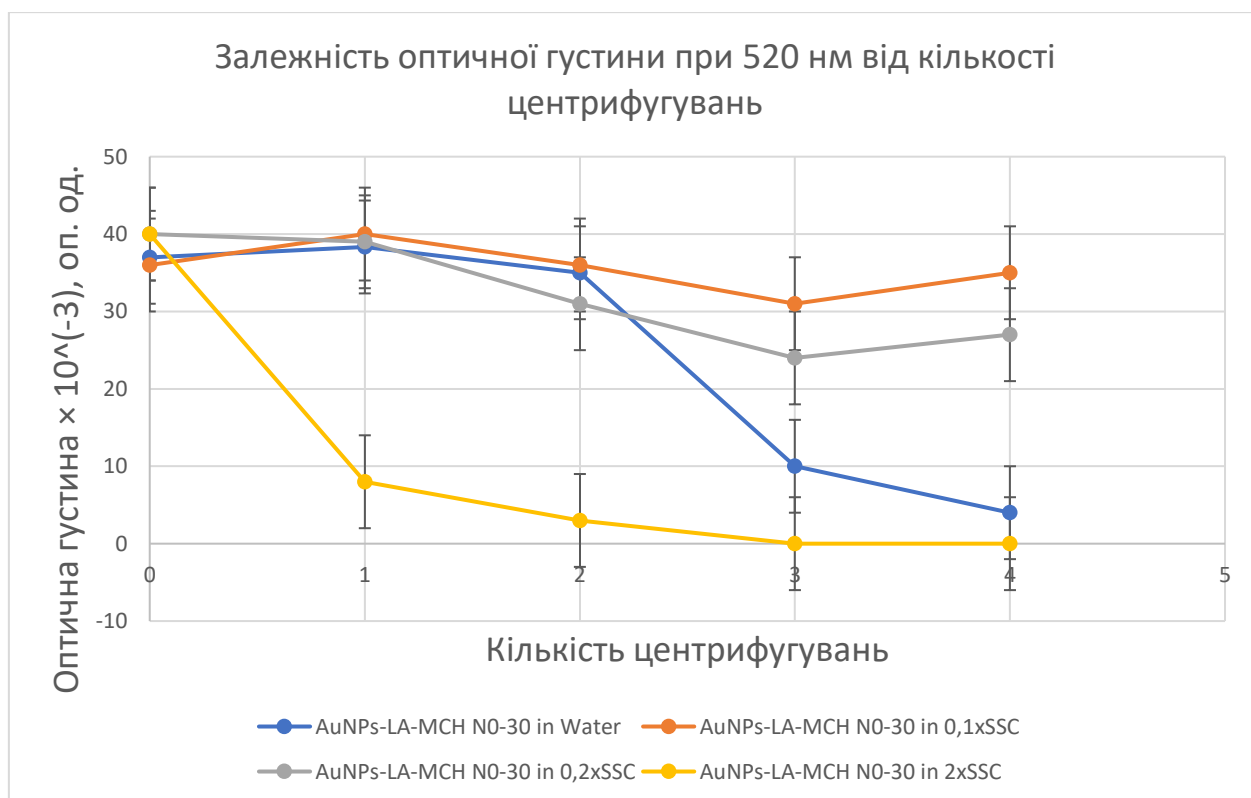


Рисунок 2.5 – Графік стабільності НЧЗ, модифікованих блокувальними молекулами під час центрифугування в різних хімічних середовищах

З наведеного наведеного графіку можна побачити, що в таких хімічних середовищах, як деіонізована вода та 2xSSC наночастинки золота модифіковані лише меркаптогексанолом та ліпоєвою кислотою агрегують та випадають в осад. В концентрованому розчині SSC така реакція виникає через занадто велику іонну силу. В деіонізованій воді природа такого процесу може бути пояснена гідрофобною взаємодією між неполярними блокувальними молекулами на поверхні НЧЗ.

Нижче наведено графік результатів досліджень залежності оптичної густини від кількості центрифугувань для наночастинок золота модифікованих олігонуклеотидами та блокувальними молекулами (рис. 2.6).

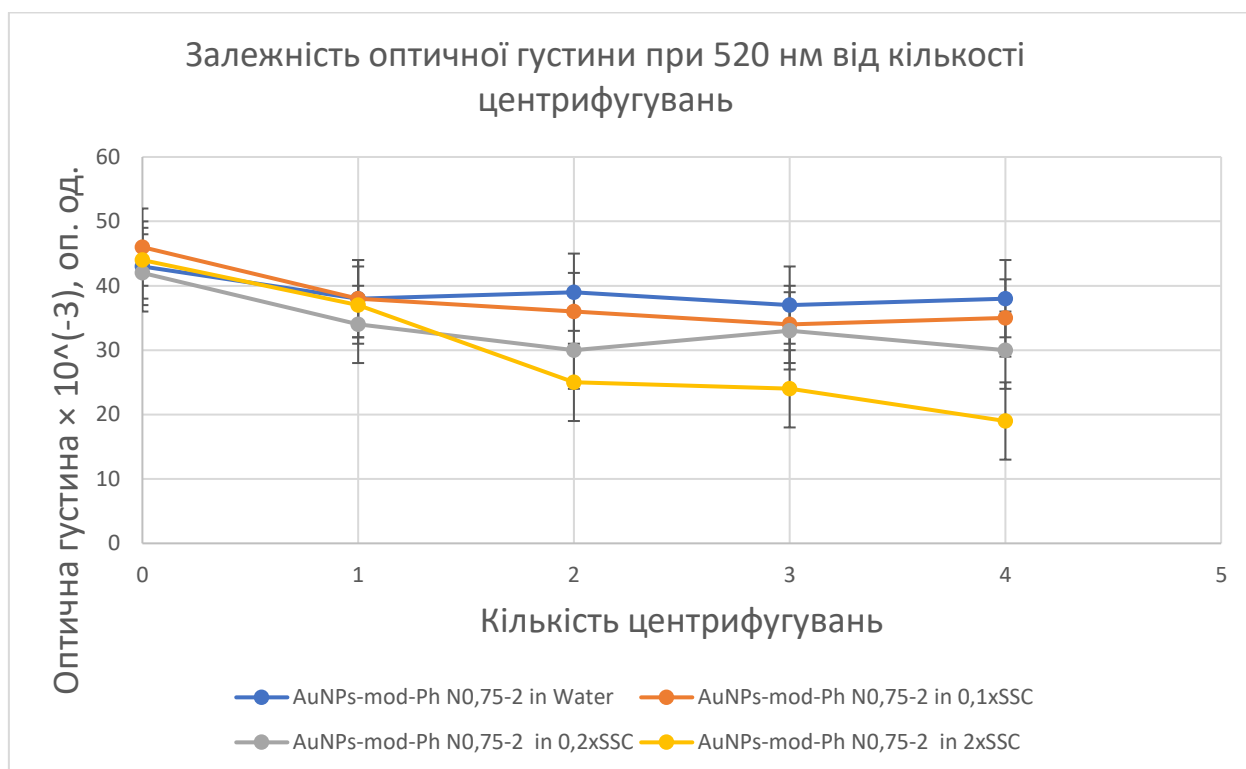


Рисунок 2.6 – Графік стабільності НЧЗ, модифікованих тіольованими олігонуклеотидами та блокувальними молекулами в різних хімічних середовищах

Під час цього дослідження було виявлено, що агрегація наночастинок відбувається повільніше, це зумовлено тим, що тіольовані олігонуклеотиди та блокувальні молекули повністю покривають НЧЗ, створюючи як електростатичні, так і стеричні перешкоди агрегації, через це вони більш

стабільні в розчинах SSC. Отже, довгострокове зберігання кінцевих НЧЗ може відбуватися як в деіонізованій воді, так і в розчинах SSC низької кратності.

Інкубовані наночастинки золота слід розділити на супернатант та пелету щоб виділити їхній основний об'єм. Центрифугування проходить протягом однієї години при температурі 4 °С з швидкістю 13400 об/хв. Центрифуга від Ventalab забезпечує всі необхідні умови для цього, а саме охолодження, точний температурний контроль та високу швидкість обертання ротору.

Отриманий після центрифугування розчин потрібно розділити, для цього працівник має виконати ручну роботу, а саме зібрати супернатант піпетковим дозатором не розмішуючи пелету.

Після процесу модифікації, з метою подальшого використання, до модифікованих наночастинок золота додають буферний розчин та піпетують їх від трьох разів для того, щоб НЧЗ рівномірно розподілилися по всьому зразку. Така кількість піпетувань була визначена експериментально. Проведено дослід з двома відповідними пробами та контрольним зразком. В ході експерименту наночастинки золота були процентрифуговані, після чого після кожного піпетування була зафіксована їхня оптична густина та порівняна з контрольною пробою (рис. 2.7).

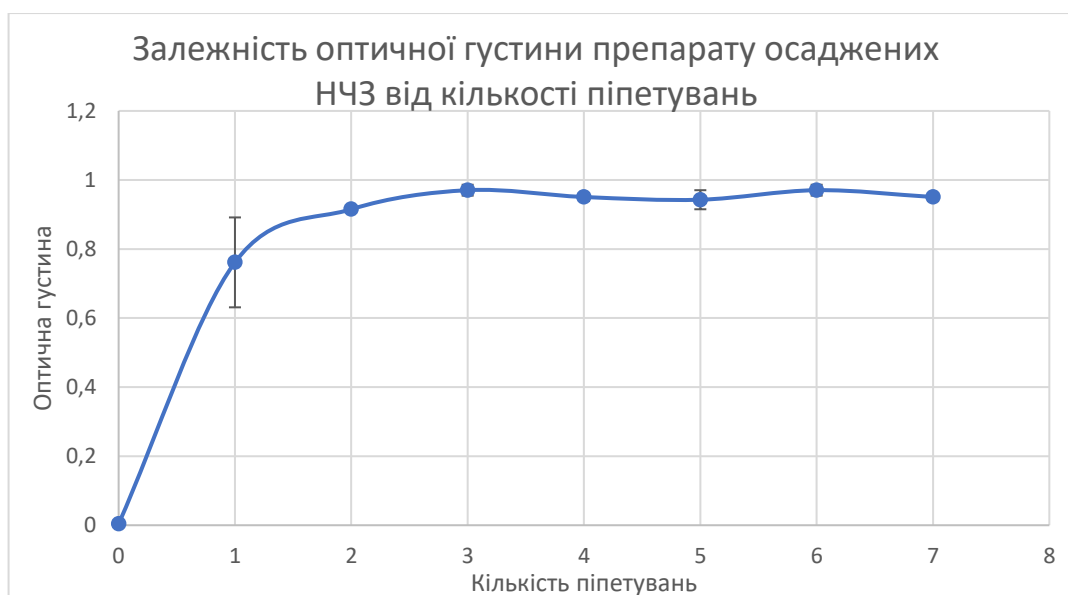


Рисунок 2.7 – Нормовані значення оптичної густини препаратів НЧЗ після їх центрифугування в залежності від кількості наступних піпетувань.

З даного дослідження можна зробити висновок, що трьох піпетувань піпетувань достатньо для того, щоб НЧЗ рівномірно розподілилися по всьому зразку.

З метою підтвердження можливості успішного застосування модифікованих наночастинок золота в сендвіч структурі біосенсора, було отримано результати експериментів з некомплементарного та комплементарного зв'язування НЧЗ з поверхнею ППР-біосенсора наведені на рисунку 2.8. Аналізуючи отримані біосенсорні відгуки, можна зробити висновок про значне посилення сигналу ППР модифікованими НЧЗ, а також про можливість регенерації (десорбції) поверхні біосенсора після проведення експерименту.

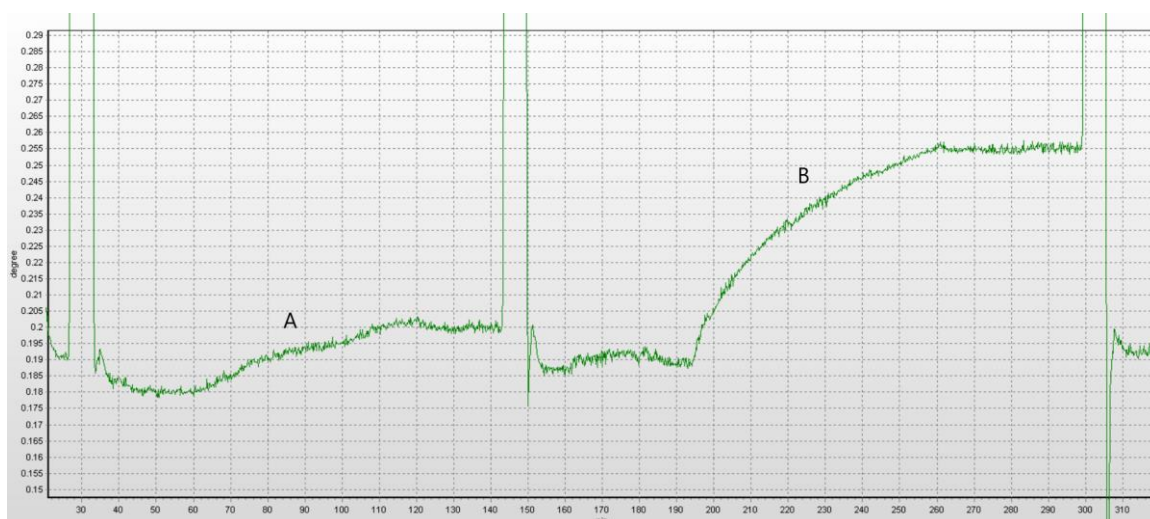


Рисунок 2.8 – Графік залежності відгуку ППР-біосенсора від часу. А – внесення НЧЗ, некомплементарних до сенсорної поверхні; В – внесення комплементарних НЧЗ.

В ході експериментів було встановлено, що межа детектування ДНК-маркерів розробленою біосенсорною системою становила 100 пМ, що є кращим за більшість відомих ППР біосенсорів.

В таблиці 2.1 наведено вартість 1 літру модифікованих наночастинок золота.

Таблиця 2.1 – Вартість 1 літру модифікованих наночастинок золота

Продукт	Компонент	Концентрація	Ціна компонента	Вартість компонента на 1 літр
	НЧЗ	2,5 нМ	15,6 грн за 1 л	3 грн
	Олігонуклеотиди	0,75 мкМ	3043 грн за 10 нМ	450 грн
	Буферний розчин	2xSSC	1400 грн за 1 л	70 грн
	Деіонізована вода	–	60 грн за 1 л	34 грн
	ліпоєва кислота	2 мкМ	330 грн за 1л	7 грн
	6-меркапто-1-гексанол	2 мкМ	67 грн за 1л	2 грн
Вартість 1 л середовища				566 грн

2.2 Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Забезпечення належного санітарного стану на виробництві та робочому місці гарантує високу якість виробленого продукту та запобігає пошкодженню вихідної сировини і готової продукції. Крім того, це гарантує безпеку персоналу від можливих ризиків, пов'язаних із необережним поводженням.

ДР 1.1 Підготовка дезінфікуючих і миючих розчинів

ДР 1.1.1 Підготовка дезінфікуючих розчинів

На цій стадії відбувається приготування дезінфікуючих розчинів, зі складу беруть концентрат дезінфікуючого засобу та розводять з дистильованою водою для підготовки виробничих приміщень раз на тиждень.

ДР 1.1.2 Підготовка миючих розчинів

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						33
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На цій стадії відбувається приготування миючих розчинів, зі складу беруть миючий засіб та розводять з дистильованою водою для щоденного прибирання, стерилізації посуду та інструментів та використання працівниками.

ДР 1.2 Підготовка персоналу

Усі працівники повинні мати належну кваліфікацію та підготовку, а також проходити початкове та подальше навчання відповідно до виконуваних функцій.

ДР 1.2.1 Медичний огляд

Відповідно до статті 17 ЗУ «Про охорону праці» - працівники мають проходити попередній (під час прийняття на роботу) і періодичні медичні огляди. Співробітників з інфекційними захворюваннями або відкритими ранами, а також тих, хто є носіями патогенної мікрофлори, не допускають до роботи, поки їхнє здоров'я повністю не відновиться. Кожен працівник зобов'язаний суворо дотримуватися правил особистої гігієни і відповідати за чистоту на своєму робочому місці. Працівники, які не пройшли медичне обстеження не допускаються до роботи.

ДР 1.2.2 Навчання та перевірка знань

Усі працівники, що займаються розробкою біосенсорів на основі ДНК повинні мати належну кваліфікацію та підготовку, а також постійно підвищувати кваліфікацію та якість роботи. Навчання працівників може мати різний обсяг і характер залежно від початкового рівня підготовки, посади, обов'язків та завдань.

Керівник відділу охорони праці надає інструктаж персоналу з техніки безпеки, включаючи навчання з проведення технологічних процесів та роботи в виробничих приміщеннях.

ДР 2 Підготовка виробничих приміщень та одягу

Усі приміщення й устаткування, що використовується у виробництві, мають піддаватися ефективній дезінфекції з метою мінімізації ризику забруднень.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.1 Стерилізація посуду та інструментів

Стерилізація за допомогою миючого розчину є обов'язковою для забезпечення наступного безпечного використання посуду та інструментів. Це особливо важливо в контексті виготовлення біосенсору, оскільки процес виробництва вимагає стерильних умов.

Контроль технологічний

ДР 2.2 Стерилізація обладнання

Все використовуване обладнання на виробництві повинно пройти стерилізацію, щоб забезпечити виготовлення біосенсору в безпечних та гігієнічних умовах. Ця процедура має на меті усунення мікроорганізмів та інших забруднень, що можуть негативно вплинути на якість та ефективність виготовлення біосенсору.

Контроль технологічний

ДР 2.3 Підготовка технологічного одягу

Персонал має бути забезпечений відповідним одягом для роботи. Одяг зберігається у складському приміщенні центру в необхідних кількостях та регулярно здається в хімчистку [33].

Контроль технологічний

ДР 2.4 Підготовка приміщень

Усі приміщення й устаткування, що використовується у виробництві, мають піддаватися ефективній дезінфекції з метою мінімізації ризику забруднень.

ДР 2.4.1 Щоденне прибирання

На початку процесу та після його проведення приміщення миють миючими та дезінфекційними засобами. Щоденне прибирання повинно проводитись щоразу після кожної зміни вологим способом.

Контроль технологічний

ДР 2.4.2 Генеральне прибирання

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						35
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Генеральне прибирання приміщень проводять 1 раз на тиждень. Прибирання підлоги, стін, стелі, повітропроводів, підвіконня, поверхні всього обладнання, комунікацій і меблів. Обробку проводять відповідними стосовно походження матеріалів миючими та дезінфекційними засобами.

Контроль технологічний

ДР 3 Підготовка повітря

Ефективне очищення повітря в приміщеннях виробництва визначається як ключовий етап підготовки, оскільки повітря може слугувати потенційним джерелом забруднення як вихідних матеріалів, так і готової продукції.

ДР 3.1 Фільтрування повітря

Очистка повітря має на меті вловлювання значної кількості механічних часток, пилу, волосся та пилку, попереднім фільтруванням.

Контроль технологічний

ДР 3.2 Стабілізація термодинамічних показників повітря

На даному етапі основною метою є доведення повітря до оптимальної вологості. Відповідно, зволоження повітря відбувається за допомогою форсунок, що розпилюють вологу.

Контроль технологічний

ДР 4 Підготовка температурного режиму

Повітря має бути 22 °С, через це повітря проходить через теплообмінник який залежно від необхідності або охолоджує, або нагріває його [32].

Контроль технологічний

ДР 5 Огляд та підготовка обладнання перед використанням

Для правильної роботи біосенсору потрібно перевірити та підготувати обладнання.

ДР 5.1 Перевірка системи на герметичність

На даному етапі перевіряється герметичність біосенсора, а саме перевіряються його трубки та конструкція на те, що вони перешкоджають проникненню крізь них газу, рідини або пари.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						36
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Контроль технологічний

ДР 5.2 Перевірка кювети на присутність бульбашок

Кювета має бути без бульбашок, працівники мають це перевірити. Якщо бульбашки будуть присутні, це вплине на роботу біосенсора, а саме на точність спектру який буде отриманий в результаті вимірювання.

Контроль технологічний

ДР 5.3 Повірка спектрометра ППР

Перед використанням сектрометра його потрібно налаштувати та перевірити на точність.

Контроль технологічний

ДР 6 Підготовка матеріалів для біосенсора

Даний етап включає підготовку реагентів та їхнє маркування.

ДР 6.1 Підготовка деіонізованої води

Так як, деіонізована вода на виробництві не виробляється, робітники повинні принести її зі складу та розпакувати. Після чого вони розливають її в тари з необхідним об'ємом та наносять маркування з датою розливу.

Контроль технологічний

ДР 6.2 Підготовка хімічних речовин

Робітники мають взяти зі складу 20хSSC для приготування буферного розчину.

Контроль технологічний

ДР 6.3 Підготовка НЧЗ у формі золю

На виробництві використовуються НЧЗ у формі золю, які вже є на складі у потрібній кількості. Так як на складі НЧЗ перебувають в великих концентраціях потрібно зменшити концентрацію додавши буферний розчин відразу або саме перед технологічним процесом. На розлиті НЧЗ також наноситься маркування з їхньою концентрацією, буферним розчином, якщо є та дата [20].

Контроль технологічний

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 6.4 Підготовка стабілізуючих речовин

Робітники мають взяти зі складу стабілізуючі речовини, а саме стабілізуючі агенти (блокуючі) для іммобілізації олігонуклеотидів.

Контроль технологічний

ДР 6.5 Підготовка буферного розчину

Буферний розчин робиться на виробництві шляхом розведення 20xSSC, а саме змішуванням з деіонізованою водою, для подальшої іммобілізації олігонуклеотидів та дегазації розчинів.

Контроль технологічний, хімічний

ДР 6.6 Підготовка олігонуклеотидів

Дана стадія включає 3 етапи, які мають проходити в строгій послідовності [34].

Контроль технологічний

ДР 6.6.1 Розморожування

Олігонуклеотиди зі складу піддаються розморожуванню. Суть етапу полягає в тому, що заморожування є ефективним методом для довгострокового зберігання олігонуклеотидів. При низьких температурах реакції, що можуть привести до деградації ланцюга ДНК, протікають повільніше, що робить заморожування ідеальним для забезпечення довгострокової стабільності [37].

ДР 6.6.2 Центрифугування

Розморожені олігонуклеотиди центрифугуються. Цей крок допомагає відокремити будь-які залишки або осад, які можуть бути з олігонуклеотидами.

ДР 6.6.3 Ресуспендування

Ресуспендування допомагає створити робочий сток розчину олігонуклеотидів, який можна використовувати на подальших етапах.

ДР 6.7 Підготовка ППР-спектрометра

Перед використанням ППР-спектрометр промивають деіонізованою та дистильованою водою.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Контроль технологічний

ДР 6.8 Дегазація розчинів

Дегазація розчинів полягає в видаленні розчинених газів з розчину або робочого середовища. Оскільки, гази у розчинах можуть впливати на точність аналітичних вимірювань, кисень може спричиняти окислення реактивів та зразків, що може викликати артефакти в експериментах; також чутливість детекторів може зменшуватися через присутність бульбашок у вимірювальній кюветі.

Контроль технологічний

ТП 7 Модифікація НЧЗ

На цьому етапі наночастинки золота піддаються модифікації для утворення стійких ковалентних зв'язків між золотом та тіольованими молекулами [20, 34].

ТП 7.1 Імобілізація олігонуклеотидів на НЧЗ

Імобілізація олігонуклеотидів проходить в 5 етапів у строгій послідовності.

ТП 7.1.1 Інкубування

На цьому етапі наночастинки золота проходять інкубації протягом 12 годин при 22 °С для імобілізації тіольованих олігонуклеотидів.

Контроль технологічний, хімічний

ТП 7.1.2 Повторне інкубування

Під час другого інкубування додають тіольовані стабілізуючі речовини, що призводить до кращої стабільності модифікованих НЧЗ, та інкубують при 22 °С протягом години.

Контроль технологічний, хімічний

ТП 7.1.3 Центрифугування

Центрифугування відбувається протягом 30 хвилин зі швидкістю 13400 об/хв, для осадження НЧЗ. Після центрифугування відкидається супернатант

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						39
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

для видалення надлишкової рідини, що містить вільні тіольовані молекули і отримання відсіченої фракції, яка містить НЧЗ.

Контроль технологічний

ПВ 8 Пакування та маркування готової продукції

ПВ 8.1 Пакування

Пакування здійснюється в попередньо визначене з замовником пакування.

Контроль технологічний

ПВ 8.2 Маркування

Маркування наноситься на упаковку та містить загальні відомості про біосенсор та його склад.

ТП 9 Контроль якості готової продукції

Контроль якості важливий етап у виробництві біосенсорів, оскільки від якості залежить надійність та точність результатів отриманих за допомогою біосенсора. Перевіряється стабільність ДНК послідовностей, покриття на поверхні біосенсора та стійкість до зовнішніх факторів.

Контроль технологічний, хімічний

ТП 9.1 Зберігання готової продукції

Продукція яка проходить контроль якості переходить до наступного етапу пакування.

ЗВ 10 Знешкодження відходів

Усі відходи, які виникають при виробництві збираються в процесі роботи в спеціальні ємності для відходів, та в подальшому збираються відповідальним персоналом у міцні пакети, що регулярно передаються профільній організації для знешкодження.

Контроль технологічний, хімічний

2.3 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У таблиці наведені основні характеристики для сировини та матеріалів, які використовуються в модифікації наночастинок золота.

Таблиця 2.2 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія та номер НТД, відповідно до якої перевіряються необхідні показники	Показники, обов'язкові для перевірки	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 НЧЗ у формі золю	—	Відсутність агрегації; Мікробіологічна чистота	Для подальшої модифікації
1.2 Ліпоєва кислота	—	Мікробіологічна чистота	Для стабілізації НЧЗ
1.3 6-меркапто-1-гексанол	—	Мікробіологічна чистота	Для стабілізації НЧЗ
1.4 Олігонуклеотиди	—	Мікробіологічна чистота	Для подальшої іммобілізації на поверхні НЧЗ
1.5 Буферний розчин 2xSSC	—	Мікробіологічна чистота; рН	Для розведення НЧЗ
2. Матеріали			
2.1 Деіонізована вода	ДСТУ ISO 3696:2003	Мікробіологічна чистота; рН; Прозорість	Для розведення буферного розчину
2.2 Дистильована вода	ДСТУ ISO 3696: 2003	Прозорість; рН; Жорсткість; Мікробіологічна чистота; Прозорість	Для миючих та дезинфікуючих засобів
2.3 Миючий засіб «PANPRO 212»	ТУ У 22902465.005-96	Відсутність забруднення	Для стерилізації посуду та інструментів
2.4 Дезинфікуючий засіб «PANPRO 211»	ТУ У 22902465.004-95	Відсутність забруднення	Для стерилізації обладнання та прибирання приміщень
2.5 Мило господарське	ДСТУ 4544:2006	Зовнішній вигляд	Для гігієни персоналу

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Продовження таблиці 2.2

3. Допоміжна сировина			
3.1 Пробірки центрифужні	EN ISO 13485:2016	Цілісність пробірки; Відсутність відшаровування пластику	Для зберігання розчинів
3.2 Технологічний одяг	ISO 13688	Цілісність; Відсутність забруднення	Для персоналу
3.3 Нітрилові рукавички	ДСТУ EN 374-1:2005	Цілісність	Для персоналу
3.4 Губки	ДСТУ ISO 6916-1:2009	Відсутність забруднення	Для прибирання
3.5 Дозатори	ДСТУ 8892:2019	Цілісність; Точність вимірювання	Для приготування розчинів
3.6 Наконечники одноразові	ISO 13485	Цілісність; Мікробіологічна чистота	Для дозаторів
3.7 Етикетки	ТУ 9571-002-14350732-2006	Цілісність; Відсутність забруднення	Для маркування розчинів
3.8 Маркер	—	Цілісність	Для маркування розчинів

2.4. Матеріальний баланс

Для виробництва біосенсору на основі ДНК потрібні: наночастинки золота, олігонуклеотиди, буферний розчин, деіонізована вода, стабілізуючі речовини (ліпоева кислота, 6-меркапто-1-гексанол) та витратні предмети, такі як одноразові наконечники дозаторів. Матеріальний баланс основних стадій виробництва біосенсору відображено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 – Матеріальний баланс етапів виробництва біосенсору на основі ДНК, пакування та маркування готового біомедичного продукту

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість		
	кг	шт	мл		кг	шт	мл
ТП 7 Модифікація НЧЗ							
НЧЗ	—	—	0,057 7	Модификованні НЧЗ	—	—	0,3
Олігонуклеотиди	—	—	0,045	—	—	—	—
Буферний розчин	—	—	0,015	—	—	—	—
Деіонізована вода	—	—	0,170 3	—	—	—	—
Стабілізуючі речовини: — ліпоєва кислота — 6-меркапто-1-гексанол	—	—	0,006 0,006	—	—	—	—
Всього	—	—	0,3	Всього	—	—	0,6
ПВ 10 Пакування та маркування готової продукції							
Модификованні НЧЗ	—	—	0,3	Готовий продукт	—	30	—
Пробірки	—	30	—	Пробірки	—	30	—
Упаковка	—	30	—	Упаковка	—	30	—
Етикетки	—	60	—	Етикетки	—	60	—
Всього	—	120	—	Всього	—	150	—

2.5 Контроль процесу виготовлення

В таблиці наведено перелік основних та підготовчих етапів процесу оптимізації біосенсора на основі ДНК.

Таблиця 2.4 – Контроль виробництва

№ контро- льної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періоди- чність перевірки та порядок відбору проби	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
K1.1.1	Дезінфікуючі розчини, концентрація	Мірний посуд, ваги	Щодня	0,2% розчин Хлорантоїну, 76% розчин етанолу
K1.1.2	Миючі розчини, концентрація	Мірний посуд, ваги	Щодня	0,5% Біомою
K2.1	Посуд та інструменти, температура, стерильність	Термометр	Кожного процесу	$t = 120 - 180^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіологічного забруднення
K2.2	Обладнання, температура, тривалість, тиск в автоклаві, стерильність	Термометр, годинник, манометр	Кожного процесу	$t = 140^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30''$, $P = 0,2 \text{ МПа}$, відсутність мікробіологічного забруднення
K2.3	Технологічний одяг, мікробіологічна чистота	Мікро- біологічний аналіз змивів	Щодня	$< 5 \text{ КУО/пластина}$
K2.4.1	Поверхні в лабораторії, мікробіологічна чистота	Мікро- біологічний аналіз змивів	Щодня	$< 5 \text{ КУО/пластина}$
K2.4.2	Поверхні в лабораторії, мікробіологічна чистота	Мікро- біологічний аналіз змивів	Щотижня	$< 5 \text{ КУО/пластина}$
K3.2	Повітря, вологість	Гігрометр	Щодня	$W = 50 - 60\%$
K4	Повітря, температура	Термометр	Щодня	$t = 22^{\circ}\text{C}$

Продовження таблиці 2.4

K6.1	Деіонізована вода, рН, температура, провідність, мікробіологічна чистота	рН-метр, термометр	Кожного процесу	рН = 5,5, t = 22°C, R ≤ 0,3 мкСіменсів/см відсутність мікробіологічного забруднення
K6.2	Хімічні речовини (20xSSC), температура, рН, мікробіологічна чистота	Термометр, рН-метр	Кожного процесу	t = 22°C, рН = 7, відсутність мікробіологічного забруднення
K6.3	НЧЗ у формі золю, температура, колоїдна стабільність, середній діаметр, мікробіологічна чистота	Термометр, спектрофотометр, зета-сайзер	Кожного процесу	t = 2 – 8°C, Оптична густина 520/650 нм ≥ 20 відносних одиниць, d =15-19 нм, відсутність мікробіологічного забруднення
K6.4	Стабілізуючі речовини, температура	Термометр	Кожного процесу	t = 22°C, відсутність мікробіологічного забруднення
K6.5	Буферний розчин, температура	Термометр	Кожного процесу	t = 22°C, відсутність мікробіологічного забруднення
K6.6	Олігонуклеотиди, температура	Термометр	Кожного процесу	t = 22°C, відсутність мікробіологічного забруднення
K6.6.1	Інкубатор, температура	Термометр	Під час процесу	t = 22°C
K7.1.1	Інкубатор, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу	t = 22°C, τ = 12'
K7.1.2	Інкубатор, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу	t = 22°C, τ = 1'
K7.1.3	Центрифуга, температура, час	Годинник, термометр,	Під час процесу	v = 13400 об/хв, t = 22°C, τ = 30''

Продовження таблиці 2.4

K7.1.4	Супернатант, оптична густина	Спектрофотометр	Під час процесу	520 нм (оптичні одиниці) ≤ 5
K7.1.5	Очищені НЧЗ, температура, мікробіологічна чистота	Термометр	Під час процесу	$t = 22^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіологічного забруднення
K9.1	Матеріал для пакування та маркування, цілісність	Візуально	Під час процесу	Без пошкоджень
K9.2	Контейнер з модифікованими НЧЗ, температура	Температура	Під час процесу	$t = 2 - 8^{\circ}\text{C}$

2.6 Стандартизація біомедичної продукції

Для подальшого випуску модифікованих наночастинок золота вони мають відповідати таким стандартам.

Таблиця 2.5 – Специфікація якості на біомедичний продукт

Показник контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис	Рідина рожевого насиченого кольору без включень	Візуально
Стерильність	Стерильність модифікованих наночастинок золота	Візуально

Висновки до розділу 2

Уданому розділі було визначено та розглянуто етапи виготовлення розчину модифікованих наночастинок золота для оптимізації біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії.

Допоміжні етапи технологічного процесу включають: гігієнічні заходи для підготовки виробництва, підготовку робочих приміщень та спецодягу працівників, підготовку очищеного повітря, стабілізацію термодинамічних параметрів повітря, підготовку обладнання перед використанням та підготовку реагентів для роботи з біосенсором.

Основні етапи технологічного процесу включають: модифікацію наночастинок золота та їхню подальшу іммобілізацію.

На основі цього технологічного процесу були розроблені технологічна та апаратурна схеми виробництва.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3 АПАРАТУРНО-ІНЖЕНЕРНА ЧАСТИНА

3.1 Обґрунтування конструкції технологічного устаткування

Основа роботи біосенсора полягає в явищі поверхневого плазмонного резонансу. Тому основною метою оптимізації є застосування модифікованих наночастинок золота для покращення аналітичних характеристик біосенсорів ДНК-гібридизації на основі спектрометрії ППР [38].

Значну частину робіт персонал виконує вручну (дозування речовин та сумішей, ресуспендування, контроль якості отриманих розчинів, та ін.) і потребують стерильних умов для унеможливлення погіршення якості продукції та безпеки персоналу. Так як, модифікація наночастинок золота займає значну частину технологічного процесу, з метою покращення виробничого процесу (більшої точності, економії часу) було проведено автоматизацію процесів. Під час іммобілізації олігонуклеотидів на НЧЗ потрібна їхня інкубація в інкубаторі та наступне центрифугування для відбирання концентрованого розчину іммобілізованих НЧЗ для цього було обрано центрифугу.

Апаратурно-технологічна схема даних процесів виглядає наступним чином (рис. 3.1):

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

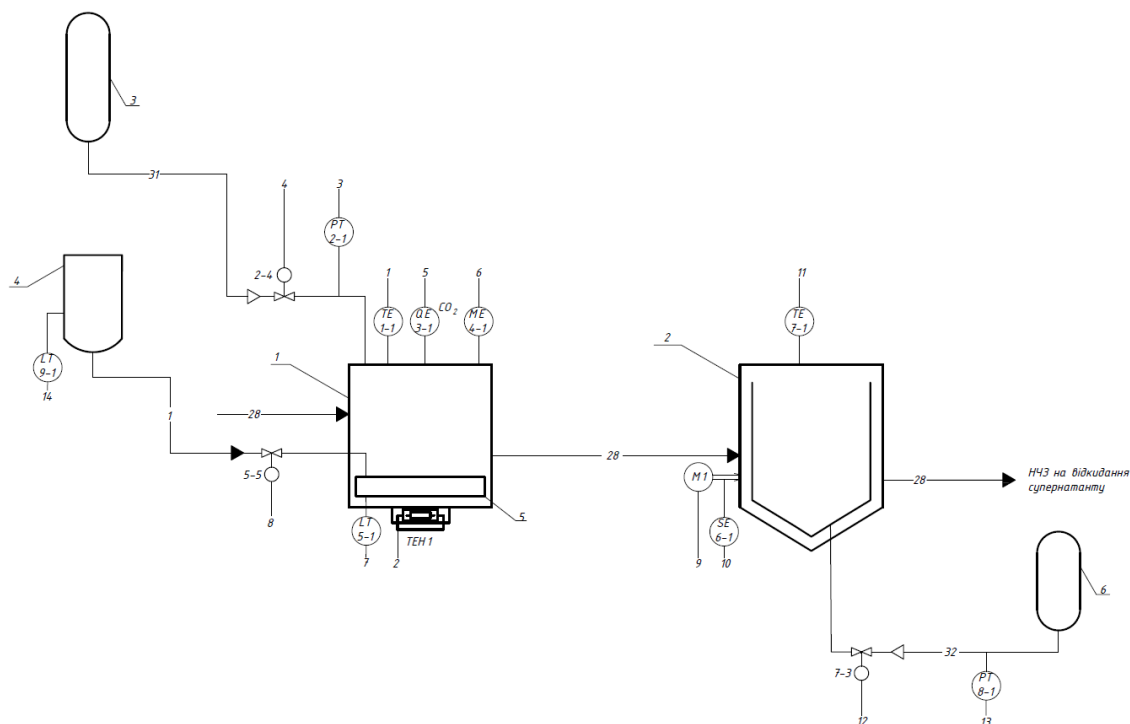


Рисунок 3.1 – Апаратурно-технологічна схема інкубування та центрифугування модифікованих наночастинок золота:

1 – інкубатор; 2 – центрифуга; 3 – балон з CO₂; 4 – бак з дистильованою водою; 5 – резервуар для дистильованої води; 6 – балон з фреоном

Для інкубування наночастинок золота необхідно підтримувати сталу температуру протягом певного часу. Ці необхідні показники може забезпечити інкубатор. Цей прилад забезпечує точну терморегуляцію та рівномірний розподіл тепла з вологістю, високу продуктивність та енергоефективність. Інкубовані наночастинок золота після інкубації потрібно осадити, щоб виділити концентрований розчин. Реалізувати це можна, використовуючи центрифугу. Цей апарат забезпечує високу швидкість обертів, герметичність та охолодження, отже НЧЗ потрібно зберігати при сталій температурі. Також двигун працює сповільнено при запуску та по закінченню часу операції для унеможливлення пошкодження пробірок з матеріалами [20].

3.2 Розробка схеми автоматизації лабораторної установки

Проаналізувавши особливості технологічного процесу оптимізації біосенсора на основі ДНК, його апаратурного оформлення та норм технологічного режиму необхідно забезпечити такий рівень автоматизації виробництва:

- контроль і регулювання температури повітря 22 °С, концентрацію вуглекислого газу 5% та рівня вологості 50-60% всередині інкубатора
- контроль та регулювання кількості обертів центрифуги 13400 об/хв та температури всередині 4 °С

Слід також передбачити додатково контроль тиску балону з CO₂, рівня води, необхідної для випаровування в інкубаторі та тиску в трубопроводі з фреоном.

Параметри контролю та регулювання виробництва наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Параметри контролю та керування виробництвом

№ пор.	Назва стадії процесу (технологічний об'єкт), місце заміру параметра	Назва контрольованого чи регульованого параметра	Норми технологічного режиму та допустимі відхилення	Вимоги до рівня автоматизації
1	2	3	4	5
1.	Інкубатор	Температура	22 °С	контроль, регулювання
2.	Інкубатор	Концентрація CO ₂	5%	контроль
3.	Інкубатор	Вологість	50-60%	контроль
4.	Центрифуга	Оберти	13400 об/хв	контроль, регулювання
5.	Центрифуга	Температура	4 °С	контроль, регулювання
6.	Балон з CO ₂	Тиск	—	контроль, регулювання

Продовження таблиці 3.1

7.	Резервуар для дистильованої води	Рівень	—	контроль
8.	Трубопровід з фреоном	Тиск	—	контроль
9.	Бак з дистильованою водою	Рівень	—	контроль

3.2.1 Опис розробленої схеми автоматизації

Мета розробки схеми автоматизації полягає у забезпеченні ефективної роботи всього технологічного обладнання, підвищенні продуктивності виробництва, покращенні якості готової продукції та забезпеченні стабільності, контролю, керування та реєстрації технологічних параметрів на визначеному рівні. Додатково, такі схеми спрямовані на мінімізацію можливих помилок, які можуть виникнути через дії персоналу. Для досягнення цих цілей визначають та впроваджують різні системи автоматичного контролю та регулювання параметрів технологічного процесу [39].

Для контролю та регулювання температури повітря всередині інкубатора розроблено контур 1, що складається з ТЕН1, первинного вимірювального термоперетворювача опору (1-1), вторинного показувального та регулюючого приладу (1-2), реле часу (1-2) та підсилювача потужності (1-3).

Контур 2 застосовують для контролювання надходження тиску вуглекислого газу за допомогою вимірювального тензоперетворювачу тиску (2-1), вторинного показувального і реєструвального приладу (2-2), регулятора пневматичного пропорційно-інтегрального (2-3) та механізму виконавчого обертового (2-4).

Контроль та регулювання концентрації вуглекислого газу в інкубаторі забезпечує контур 3, який включає первинний перетворювач термомагнітного газоаналізатора (3-1), електронний показувальний прилад (3-2).

Контроль вологості повітря всередині інкубатора відбувається в контурі 4 за допомогою вимірювача (4-1) та показувального приладу (4-2).

Контур 5 застосовують для контролю рівня дистильованої води, що поступає в резервуар всередині інкубатора для випаровування. Контур містить вимірювальний прилад (5-1), електропневматичний перетворювач (5-2), прилад вторинного пневматичного показування і реєстрації (5-3), регулятор пневматичний пропорційно-інтегральний (5-4), механізм виконавчий обертовий (5-5).

Контур 6 забезпечує регулювання та контроль кількості обертів двигуна M1 центрифуги. Контур включає первинний вимірювальний прилад тахометр (6-1) та вторинний регулюючий та показувальний прилад (6-2).

Контроль та регулювання температури всередині центрифуги здійснює контур 7, який включає первинний вимірювальний термоперетворювач опору (7-1), вторинний показувальний та регулюючий прилад (7-2), реле часу (7-2), механізм виконавчий обертовий (7-3).

Для контролю тиску фреону в трубопроводі розроблено контур 8, що включає вимірювальний тензоперетворювач тиску (8-1) та вторинний показувальний прилад (8-2).

Контроль рівня дистильованої води в баку відбувається завдяки контуру 9, який складається з вимірювального приладу (9-1) та реєструвального приладу (9-2).

Висновки до розділу 3

В ході виконання даного розділу була проаналізована інформація, стосовно апаратурно-інженерної частини диплома та створена схема автоматизації виробництва з оптимізації біосенсорної системи для

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						52
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

детектування ДНК маркерів. Було обране технологічне устаткування, яке забезпечує всі необхідні умови для якісного виробництва.

Розроблена схема складається з 9 контурів для забезпечення контролю та керування параметрів різного рівня. Основні характеристики устаткування, виробів та матеріалів записані в специфікації.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						53
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

Дипломний проєкт виконується на базі кафедри ТМБ, факультету БМІ, НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського».

Робота виконується за першим тематичним планом, тому метою дипломної роботи є оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії.

Мета цього розділу полягає у виявленні та оцінці потенційно небезпечних і шкідливих виробничих факторів, що створюються при роботі з біосенсором і його складовими, а також у розробці заходів для їх усунення.

4.1 Характеристика виробничого приміщення

Оптимізація біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів хронічної мієлоїдної лейкемії проводиться в хімічній лабораторії. Лабораторія добре освітлена, за допомогою стельових світильників. Окрім цього вікна лабораторії з виходом на південь, через це в лабораторію потрапляє природнє освітлення. У приміщенні забезпечена природна та штучна вентиляції. Підлога в лабораторії покрита лінолеумом, стіни, стеля та двері пофарбовані у світлі тони. Двері гладкі, без виступів. Необхідно забезпечити клас чистоти не нижче рівня В.

В таблиці 4.1 наведені параметри приміщення та перелік наявного обладнання й оснащення зі специфікацією.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.1 – Параметри приміщення, специфікація обладнання і оснащення

№	Найменування	Основні характеристики	Кількість	Позиція на рисунку
1	2	3	4	5
Приміщення				
1	Параметри приміщення	8000 × 3000 × 2600 мм; S = 24 м ² ; V = 62,4 м ³	–	–
2	Кількість працюючих	науковий співробітник, лаборант	2	–
1	2	3	4	5
3	Природне освітлення	вікно металопластикове Veka WHS60, однокамерне, поворотно-відкидне, 1500 × 1500 мм	3	1
4	Штучне освітлення	стельовий світильник LED-DLS-6/3, 5670 Лм, 1500 × 174 × 24 мм	4	2
5	Вентиляційна система	припливно-витяжна установка Slimstar-Pap, 1244 × 438 × 969 мм	1	–
6	Опалення	радіатор алюмінієвий Fondital Blitz Super B4, 1408,8 Вт, 640 × 100 × 557 мм	3	3
7	Знезаражування	медичний стерилізатор з кварцовою лампою BactoSfera, 500 × 100 × 100 мм	1	4
Обладнання, оснащення, матеріали				
8	Центрифуга Sigma 4-5KL	розмір, мм: 390 × 602 × 634; напруга: 220-240 В, 50 Гц	1	5
9	Кондиціонер	розмір, мм: 698 × 255 × 190; напруга: 220-240 В	1	6
10	Ваги лабораторні	розмір, мм: 270 × 180 × 70; матеріал: сталь, пластик; клас виробу за ступенем захисту: IP20; напруга: ~ 220 В, 50-60 Гц	1	7
11	Стіл-мийка лабораторна	розмір, мм: 1200 × 750 × 900; матеріал: метал з полімерним покриттям	1	8
12	Стіл лабораторний	розмір, мм: 1200 × 750 × 900; матеріал: метал з полімерним покриттям	3	9

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

Продовження таблиці 4.1

13	Стіл для аналітичних ваг	розмір, мм: 900 × 750 × 900; матеріал: метал, полірований граніт	1	10
14	Двокамерний холодильник	розмір, мм: 2020 × 595 × 670; матеріал: метал, скло; напруга: ~ 220 В, 50 Гц; рівень звукової потужності: 40 дБА; температурний режим: 0...+15°C	1	11
1	2	3	4	5
15	Шафа лабораторна	розмір, мм: 900 × 600 × 1920; матеріал: сталь	2	12
16	Стіл письмовий Karup	розмір, мм: 1000 × 400 × 750 матеріал: дерево, каркас: метал	1	13
17	Стілець лабораторний СП-4.1 м'який на ніжках	розмір, мм: 380 x 390 x 810 мм матеріал оббивки: штучна шкіра	3	14
18	Пожежний сповіщувач	димовий Тирас ДЕТЕСТО НТ110, 110 × 110 × 50 мм	2	15
19	Вогнегасник	порошковий, ОПУ-10, ємність 10 л	1	16

На рисунку 4.1 наведено план проєктованої лабораторії, а в таблиці 4.2 розглянуто характеристики приміщення та їхня відповідність вимогам нормативних документів.

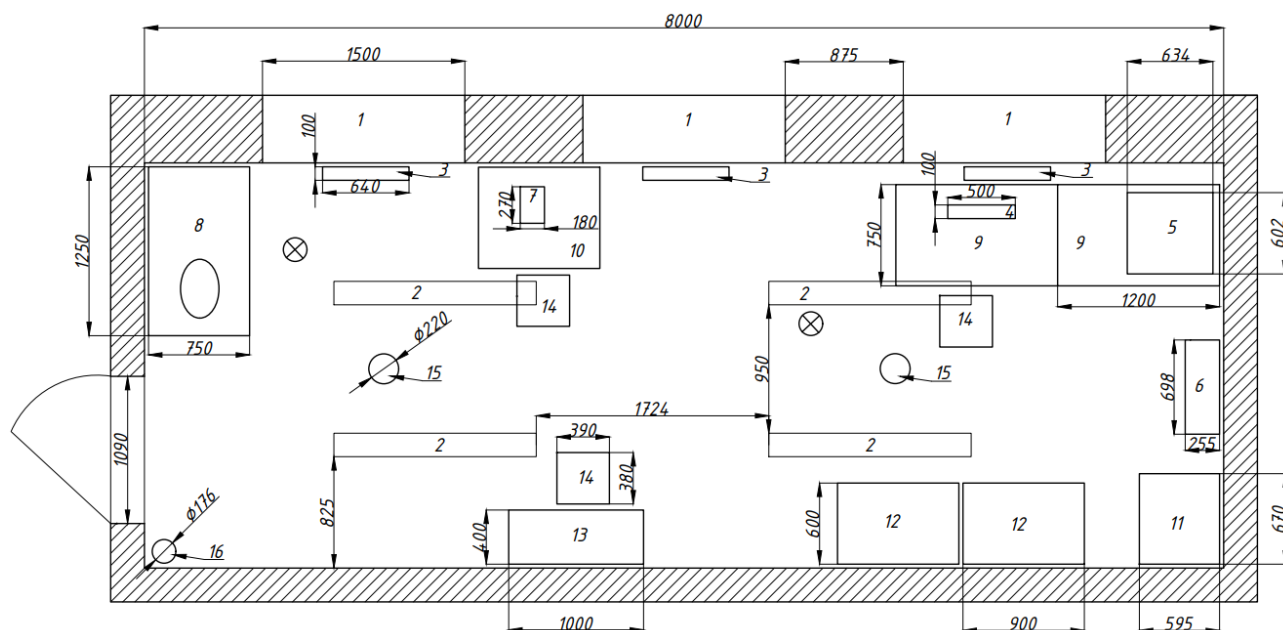


Рисунок 4.1 – План-схема лабораторії

Таблиця 4.2 – Реальні та нормативні характеристики приміщення і розміщення технологічного обладнання

№	Параметр приміщення	Реальні значення	Нормативні значення
1	Мінімальна площа на 1 працюючого	8 м ²	6 м ²
2	Мінімальний об'єм на 1 працюючого	26 м ³	20 м ³
3	Мінімальна ширина проходу	1,5 м	1,5 м
4	Мінімальна відстань між технологічним обладнанням (робоча зона)	1 м	1 м
5	Мінімальна відстань між технологічним обладнанням (неробоча зона)	0,6 м	0,6 м

З результатів таблиці 4.2 можна зробити висновок, що даний кабінет відповідає всім необхідним нормам ДСТУ Б В.1.1-36:2016. Заходи нормалізації проводити не потрібно.

4.2 Аналіз потенційних небезпек та заходи їх усунення

Згідно зі ст. 153 Кодексу законів про працю України [40], роботодавець зобов'язаний забезпечити безпечні та нешкідливі умови праці. Для аналізу було обрано основні небезпечні та шкідливі фактори в хімічній лабораторії, а саме: електробезпека, пожежна небезпека та небезпека роботи з рухомими механізмами.

4.2.1 Небезпека ураження електричним струмом

В таблиці 4.3-4.5 наведені основні джерела електронебезпеки й заходи для їхнього усунення.

Таблиця 4.3 – Небезпеки електричного характеру

№	Найменування обладнання, оснащення, матеріалів	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Центрифуга	змінний струм	перевантаження мережі; потрапляння черезмірної вологи; неправильне встановлення розеток і вимикачів; механічні пошкодження приладу або кабелю;	опіки; ураження електричним струмом; пожежа;
2	Ваги лабораторні			
3	Холодильник			
4	Кондиціонер			

Таблиця 4.4 – Реальні та нормативні значення факторів електронебезпеки, які виникають в технологічному процесі

Фактор небезпеки	Реальне значення	Нормативні значення
Максимальний струм	> 10 мА	10 мА

Таблиця 4.5 – Заходи з забезпечення ОП з електронебезпеки

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій вибору
1	2	3	4
1	Технічні заходи	заземлення розеток	запобігання перенапруженню мережі та накопичення стат. електрики
		розподіл навантаження	запобігання перевантаження мережі
		ізоляція струмопровідних частин приладів	захист від зовнішнього середовища (вологи, забруднення)
		використання автоматичних вимикачів	відключення доступу до електрики у разі аварійної ситуації

Продовження таблиці 4.5

		уникання механічних пошкоджень та потрапляння черезмірної вологи	запобігання ураженню електричним струмом та поломки приладів
2	Організаційні заходи	інструктаж з експлуатації приладів та інструментів лабораторії	навчання правилам поведінки поводження з приладами та інструментами

Заходи, наведені в таблиці 4.5, запобігають небезпеки під час роботи з електроприладами та відповідають вимогам ДСТУ Б В.2.5-82:2016.

4.2.2 Пожежна безпека

Відомості про пожежну безпеку та заходи зниження ризиків представлені в таблицях 4.6-4.8.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.6 – Джерела небезпеки пов’язані з виникненням пожежі

№	Найменування обладнання, оснащення, матеріалів	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Центрифуга	коротке замикання; електрична енергія; самозаймання; неправильне використання;	коротке замикання; недотримання умов зберігання приладів; перевантаження електромережі; хімічні реакції; недотримання правил експлуатації;	загоряння; вибухи; травмування працівників; загибел працівників; отруєння працівників;
2	Кондиціонер			
3	Ваги лабораторні			
4	Холодильник			
5	Легкозаймисті речовини			

Таблиця 4.7 – Реальні та нормативні значення факторів небезпеки

№	Фактор небезпеки	Реальне значення	Нормативні значення
1	Струм короткого замикання	наявні	відсутні

Таблиця 4.8 – Основні заходи для попередження пожежної небезпеки

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій вибору
1	Технічні заходи	установка пожежної сигналізації	виявлення пожежі на початку
		встановлення вогнегасників	запобігання пожежі
2	Організаційні заходи	інструктаж з правил поведінки з пожежонебезпечними приладами	навчання персоналу
		складання плану евакуації персоналу з виробництва	запобігання можливим небезпекам при розповсюдженні пожежі

Продовження таблиці 4.8

3	Експлуатаційні заходи	обслуговування систем сповіщення	забезпечення справного стану
		періодичне вимірювання опору ізоляції	запобігання короткого замикання

За ДСТУ 3855-99 в лабораторії дотримані необхідні правила для забезпечення безпеки працівників на виробництві.

4.2.3 Небезпека при роботі з рухомими механізмами

Інформація про джерела небезпеки при роботі з рухомими механізмами та заходи усунення ризиків наведені в табл. 4.9-4.11.

Таблиця 4.9 – Основні небезпеки, пов’язані з виникненням пожежі

№	Найменування обладнання, оснащення, матеріалів	Джерело небезпеки	Причини небезпеки	Наслідки небезпеки
1	Центрифуга	обертовий механізм	доступ до робочої зони центрифуги (технологічний фактор)	травмування кінцівок, попадання волосся

Таблиця 4.10 – Заходи попередження пожежної небезпеки

№	Фактор небезпеки	Реальне значення	Нормативні значення
1	Швидкість руху обертового механізму	300 – 13000 об/хв	0 об/хв – відсутній рух

Таблиця 4.11 – Заходи попередження небезпеки з рухомими механізмами

№	Група номенклатурних заходів з ОП	Вид заходу	Критерій вибору
1	Технічні заходи	обмеження швидкості обертового механізму клінічної центрифуги	недопущення інтенсивних режимів роботи
		подвійне блокування кришки центрифуги	захист від не передбачуваного відкриття кришки центрифуги
		реєстратор швидкості обертового механізму	індикація швидкості обертання ротору центрифуги
2	Організаційні заходи	допуск до роботи, інструктаж з роботи з центрифугою	навчання експлуатації з обладнанням
3	Режимні	недопущення появи сторонніх осіб в лабораторії	уникнення непередбачуваних наслідків
4	Експлуатаційні	перевірка засобів вимірювання	достовірність інформації при роботі з приладами

Обрані заходи з охорони праці забезпечують умови для безпечної роботи з рухомими механізмами у лабораторії.

Висновки до розділу 4

У розділі з охорони праці було розглянуто потенційні небезпеки при роботі в хімічній лабораторії, а саме при оптимізації біосенсорної системи для детектування ДНК маркерів. Розроблено план приміщення та проведено опис

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						62
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

лабораторного приладдя. Також проведено аналіз відповідності дотримання правил безпеки на виробництві. В процесі виконання даного розділу було з'ясовано, що вживання додаткових заходів для покращення безпеки не потрібно.

До основних небезпек та шкідливих факторів у даній роботі відноситься електронебезпека, небезпека займання та небезпека при роботі з рухомими механізмами. Для цього були розроблені технічні та організаційні заходи з метою усунення ризиків.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						63
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано літературні джерела про гібридизаційні ДНК біосенсиори та їхні характеристики. Встановлено, що біосенсиори на основі ДНК мають велику перспективу, через низьку границю визначення, широкі межі детектування, швидке та точне виявлення генетичних захворювань, довготривалий термін служби та низьку вартість виробництва.

2. Побудувавши калібрувальні криві залежності оптичної густини від концентрації досліджуваних наночастинок золота, за різних довжин хвиль, було виявлено, що кінцеве співвідношення оптичної густини на хвилях 520 нм та 650 нм має бути $\geq 20/1$ відповідно.

3. Було показано, що агрегація наночастинок золота модифікованих тіольованими олігонуклеотидами та блокувальними молекулами відбувається повільніше ніж наночастинок золота модифікованих лише блокувальними молекулами. Це зумовлено тим, що тіольовані олігонуклеотиди та блокувальні молекули повністю покривають НЧЗ, створюючи як електростатичні, так і стеричні перешкоди агрегації.

4. Досліджено залежність концентрації наночастинок золота у розчині після центрифугування від кількості піпетувань. Доведено, що трьох піпетувань достатньо для того, щоб НЧЗ рівномірно розподілилися по всьому зразку.

5. З метою апробації модифікованих наночастинок золота в складі біосенсора, було оцінено неспецифічні та специфічні відгуки ППР-біосенсора на введення модифікованих НЧЗ. Встановлено, що межа детектування ДНК-маркерів розробленою біосенсорною системою становила 100 пМ.

6. Було складено та описано технологічну схему отримання продукту для оптимізації гібридизаційних ДНК біосенсорів. Крім того, було детально розглянуто технологію модифікації наночастинок золота.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

7. Було розроблено апаратурну схему й схему автоматизації стадій модифікування наночастинок золота. Було розроблено 8 контурів та обрано відповідні засоби автоматизації.

8. Вивчивши особливості модифікування наночастинок золота було виявлено потенційні небезпеки до яких належить: електронебезпека, небезпека займання та небезпека при роботі з рухомими механізмами.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Šířová H., Homola J. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 773. P. 9–23. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.040> (date of access: 08.06.2024).
2. Zhai J., Cui H., Yang R. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*. 1997. Vol. 15, no. 1. P. 43–58. URL: [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(97\)00003-7](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(97)00003-7) (date of access: 08.06.2024).
3. TELES F., FONSECA L. Trends in DNA biosensors. *Talanta*. 2008. Vol. 77, no. 2. P. 606–623. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.024> (date of access: 08.06.2024).
4. DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review / Y. Hua et al. *Biosensors*. 2022. Vol. 12, no. 3. P. 183. URL: <https://doi.org/10.3390/bios12030183> (date of access: 07.06.2024).
5. Circulating tumor DNA and liquid biopsy: opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies / L. Gorgannezhad et al. *Lab on a Chip*. 2018. Vol. 18, no. 8. P. 1174–1196. URL: <https://doi.org/10.1039/c8lc00100f> (date of access: 07.06.2024).
6. Das S., Devireddy R., Gartia M. R. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor for Cancer Biomarker Detection. *Biosensors*. 2023. Vol. 13, no. 3. P. 396. URL: <https://doi.org/10.3390/bios13030396> (date of access: 07.06.2024).
7. Properties and sensing characteristics of surface-plasmon resonance in infrared light / S. Patskovsky et al. *Journal of the Optical Society of America A*. 2003. Vol. 20, no. 8. P. 1644. URL: <https://doi.org/10.1364/josaa.20.001644> (date of access: 03.06.2024).
8. Tang Q., Su X., Loh K. P. Surface plasmon resonance spectroscopy study of interfacial binding of thrombin to antithrombin DNA aptamers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007. Vol. 315, no. 1. P. 99–106. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.040> (date of access: 08.06.2024).

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						66
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

9. Lofas S. Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance. *Pure and Applied Chemistry*. 1995. Vol. 67, no. 5. P. 829–834. URL: <https://doi.org/10.1351/pac199567050829> (date of access: 07.06.2024).
10. Handbook of Surface Plasmon Resonance / ed. by R. B. M. Schasfoort. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2017. URL: <https://doi.org/10.1039/9781788010283> (date of access: 08.06.2024).
11. Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips / L. He et al. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. Vol. 89. P. 606–611. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.076> (date of access: 07.06.2024).
12. Graphene-based nanocomposites for sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensor for biological and chemical sensing: A review / P. O. Patil et al. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019. Vol. 139. P. 111324. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111324> (date of access: 07.06.2024).
13. Daniel M.-C., Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*. 2004. Vol. 104, no. 1. P. 293–346. URL: <https://doi.org/10.1021/cr030698+> (date of access: 07.06.2024).
14. Nonfunctionalized Gold Nanoparticles: Synthetic Routes and Synthesis Condition Dependence / A. Jimenez-Ruiz et al. *Chemistry - A European Journal*. 2015. Vol. 21, no. 27. P. 9596–9609. URL: <https://doi.org/10.1002/chem.201405117> (date of access: 07.06.2024).
15. Magnetic Properties of Gold Nanoparticles: A Room-Temperature Quantum Effect / R. Gréget et al. *ChemPhysChem*. 2012. Vol. 13, no. 13. P. 3092–3097. URL: <https://doi.org/10.1002/cphc.201200394> (date of access: 07.06.2024).
16. Magnetic controlling of migration of DNA and proteins using one-step modified gold nanoparticles / L. Xu et al. *Chemical Communications*. 2015. Vol. 51,

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						67
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

no. 45. P. 9257–9260. URL: <https://doi.org/10.1039/c5cc01738f> (date of access: 07.06.2024).

17. Plasmon-Induced Electrocatalysis with Multi-Component Nanostructures / P. Subramanian et al. *Materials*. 2018. Vol. 12, no. 1. P. 43. URL: <https://doi.org/10.3390/ma12010043> (date of access: 07.06.2024).

18. Shpacovitch V., Hergenröder R. Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Biosensors as Instruments with High Versatility and Sensitivity. *Sensors*. 2020. Vol. 20, no. 11. P. 3010. URL: <https://doi.org/10.3390/s20113010> (date of access: 07.06.2024).

19. Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis / A. Rachkov et al. *Talanta*. 2011. Vol. 85, no. 4. P. 2094–2099. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.032> (date of access: 08.06.2024).

20. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry / M. S. Sobolevskiy et al. *Applied Nanoscience*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2> (date of access: 08.06.2024).

21. SPR Detection and Discrimination of the Oligonucleotides Related to the Normal and the Hybrid bcr-abl Genes by Two Stringency Control Strategies / M. J. Matsishin et al. *Nanoscale Research Letters*. 2016. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1226-y> (date of access: 08.06.2024).

22. ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ РЕЦИДИВУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ІНДЕКСУ SOKAL / Д. І. Білько та ін. *Досягнення біології та медицини*. 2014.

23. Sholikah T. A. FUSION GENE BCR-ABL : FROM ETIOPATHOGENESIS TO THE MANAGEMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 2017. Vol. 8, no. 1. P. 29–37. URL: <https://doi.org/10.20885/jkki.vol8.iss1.art5> (date of access: 03.06.2024).

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						68
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

24. _Neil P. Shah, Robert J. Arceci. Leukemia and lymphoma society. Chronic Myeloid Leukemia. Bristol-Myers Squibb, 2014. 52 p

25. МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО КЛІНІЧНО-ЕКСПЕРТНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ СИСТЕМИ КРОВІ ТА КРОВОТВОРНИХ ОРГАНІВ І ПОКАЗАННЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННЯ ХВОРИХ НА МСЕК. *Методичні рекомендації для лікарів МСЕК та ЛКК*. 2007.

26. _Sassolas A., Leca-Bouvier B. D., Blum L. J. DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews*. 2008. Vol. 108, no. 1. P. 109–139. URL: <https://doi.org/10.1021/cr0684467> (date of access: 07.06.2024).

27. _Herne T. M., Tarlov M. J. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1997. Vol. 119, no. 38. P. 8916–8920. URL: <https://doi.org/10.1021/ja9719586> (date of access: 07.06.2024).

28. Investigations of aggregation stability of gold nanoparticles at their interactions with compounds bearing thiol and/or amino functional groups / Alexandre Rachkov et al. *Chemical Sensors*. 2014. Vol. 4: 16.

29. Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method / J. Dong et al. *KONA Powder and Particle Journal*. 2020. Vol. 37. P. 224–232. URL: <https://doi.org/10.14356/kona.2020011> (date of access: 07.06.2024).

30. Alkilany A. M., Murphy C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010. Vol. 12, no. 7. P. 2313–2333. URL: <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8> (date of access: 07.06.2024).

31. _Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry / M. S. Sobolevskiy et al. *Applied Nanoscience*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2> (date of access: 08.06.2024).

32. _DNA-Directed Assembly of Gold Nanowires on Complementary Surfaces / J. K. N. Mbindyo et al. *Advanced Materials*. 2001. Vol. 13, no. 4. P. 249–

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						69
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

254. URL: [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200102\)13:4%3C249::aid-adma249%3E3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200102)13:4%3C249::aid-adma249%3E3.0.co;2-9) (date of access: 08.06.2024).

33. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles / X.-D. Zhang et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2011. P. 2071. URL: <https://doi.org/10.2147/ijn.s21657> (date of access: 08.06.2024).

34. SPR Detection and Discrimination of the Oligonucleotides Related to the Normal and the Hybrid bcr-abl Genes by Two Stringency Control Strategies / M. J. Matsishin et al. *Nanoscale Research Letters*. 2016. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1226-y> (date of access: 07.06.2024).

35. Ружинська Л.І., Апаратурні схеми фармацевтичних та біотехнологічних виробництв. Порядок складання та вимоги до оформлення Л.І.Ружинська, Поводзинський В. М. А.Буртна, В.Ю. Шибецький. Посібник.Електронне видання. К.: НТУУ «КПІ», 2012.140 с.

36. Surface plasmon resonance investigation of DNA hybridization on a sensor surface using gold nanoparticles modified by specific oligonucleotides / M. J. Matsishin et al. *Biopolymers and Cell*. 2017. Vol. 33, no. 4. P. 268–281. URL: <https://doi.org/10.7124/bc.000959> (date of access: 08.06.2024).

37. The kinetics of oligonucleotide replacements / L. P. Reynaldo et al. *Journal of Molecular Biology*. 2000. Vol. 297, no. 2. P. 511–520. URL: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3573>

38. Matsishin, M. J., Kucherov, A. I., Ushenin, I. V., Lyapin, A. M., Lopatynskyi, A. M., Chegel, V. I., & Rachkov, A. E. (2017b). Surface plasmon resonance investigation of DNA hybridization on a sensor surface using gold nanoparticles modified by specific oligonucleotides. <https://doi.org/10.7124/bc.000959>

39. М. В. Лукінюк. Контроль і керування хіміко-технологічними процесами: У 2 кн. Кн. 2. Керування хіміко-технологічними процесами [Текст] : навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл., які навчаються за напрямом: «Хімічна технологія та інженерія» / М. В. Лукінюк. – К.: НТУУ «КПІ», 2012. – 336 с. :

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						70
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

іл. – Біблігр.: с. 331–332. – 300 пр. – ISBN 978-966-622-520-0. – ISBN 978-966-622-531-6 (Кн. 2)

40. Кодекс законів про працю України [Електронний ресурс] : Кодекс України від 10.12.1971 р. № 322-VIII : станом на 27 січ. 2023 р. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/322-08#Text>.

					БФ 0103. 23.30.001 ПЗ	Арк.
						71
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ

Додаток А. Специфікація обладнання, контрольно-вимірювальних приладів та апаратів

№з/п	Позначення на АС	Найменування апарату, приладу, інструменту	Виробник	Основні характеристики	Кількість	Примітки
1	2	3	4	5	6	7
1.	Д-1, Д-3, Д-7, Д-8, Д-10	Дозатор піпетковий	IKA- Werke	Об'єм: 0,1 – 1мл; Крок: 0,001 мл	5	–
2.	Р-2, Р-4, Р-9	Реактор для перемішування	BEE	Об'єм: 1000 мл ³ ; Без сорочки	3	–
3.	I-5	Інкубатор	Lmb Technolo gie	Напруга: ~ 230 В; Температурний режим: +20...+24°C; Крок: 0,1°C	1	–
4.	Ц-6	Центрифуга	Ventalab	Напруга: ~ 220 В; Діапазон регулювання швидкості: 100...13500 об/хв; Крок: 100 об/хв	1	–

Додаток Б. Специфікація устаткування, виробів і матеріалів

Позиція на схемі	Назва параметра	Середовище, місце Відбору інформації	Граничне значення параметра	Місце монтажу	Назва, технічна характеристика	Тип, марка моделі	Код	Завод-виробник	Кількість
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
УСТАТКУВАННЯ ТА ПРИЛАДИ									
1-1	Температура	Інкубатор	22 °C	Апарат 1	Термоперетворювач опору мідний 0...50 °C, 50М; діаметр захисної арматури 6 мм; $P_y = 25$ МПа, $I_{вих} = 4...20$ мА, Клас допуску А	ТСМУ-0288	—	НВФ «Стандарт-М», м. Запоріжжя	1 од.
7-1		Центрифуга	4 °C	Апарат 2	Термоперетворювач опору мідний -25...25 °C, 50М; діаметр захисної арматури 6 мм; $P_y = 25$ МПа, $I_{вих} = 4...20$ мА, Клас допуску А	ТСМУ-0289	—	НВФ «Стандарт-М», м. Запоріжжя	1 од.

Продовження додатка Б

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-2, 7-2	Те саме	Те саме	Те саме	Щит керування	Регулятор мікропроцесорний двоканальний. -40...70 °C, I _{вх} =4...20 мА, Точність індикації 0,01%, Основна похибка ≤ 0,2%	МІК-21	—	ВАТ «Підприємство “МІКРОЛ ”», м. Івано- Франківськ	2 од.
2-1	Тиск	Трубопровід 31	—	Трубопровід ід 31	Регулятор тиску прямої дії Dival, P _{вх} = 0,5...20 кПа, P _{вих} = 133...2500 кПа	МТ100 Р	—	ЗАТ «Манометр»	2 од.
8-1		Трубопровід 32		Трубопровід ід 32					
2-2	Те саме	Трубопровід 31	—	Щит керування	Вторинний показувальний і реєструвальний прилад, I _{вих} = 4...20 Ма,	ДИСК- 250ТН	—	ТОВ «ЗАВОД УКРМА ШПРОМ »	1 од.

Продовження додатка Б

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2-3	Те саме	Те саме	—	Те саме	Регулятор пневматичний пропорційно-інтегральний (система СТАРТ); витрата повітря живлення –4,5 л/хв, Р _{жив} = 0,14 МПа, Р _{вих} = 20...100 кПа	ФР009 1	—	АТ«ТИЗ-ПРИБОР»	2 од.
5-4	Рівень	Дистильована вода							
3-1	Концентрація вуглекислого газу	Повітря в інкубаторі	5%	Апарат 1, щит керування	Газоаналізатор інфрачервоний. Діапазон вимірювання 0...10%. Похибка 2%, цифровий дисплей	Н5421	—	«Comet», Чехія	1 од.
4-1	Вологість	Повітря в інкубаторі	50-60%	Апарат 1, щит керування	Датчик вологості -в корпусі на DIN-рейку, Діапазон 0...99,9%	РРВ-10/D-2ПЕП-11	—	«Укр-реле», м. Дніпро	1 од.
5-1	Рівень	Дистильована вода	—	Резервуар 5	Рівнемір гідростатичний, L _{max} = 2 м, Р _{доп} = 0,1 бар, I _{вих} = 4...20 мА, Похибка 3%	ЕС1210	—	«FineTek», Тайвань	2 од.
9-1				Резервуар 4					

Продовження додатка Б

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9-2	Те саме	Те саме	—	Щит керування	Показувальний і реєструвальний прилад А100-Н, $I_{вх} = 4 \dots 20$ мА	А100-Н	—	«Пром-техсервіс» м. Київ	1 од.
5-2	Те саме	Те саме	Те саме	Місцевий	Перетворювач електропневматичний, $I_{вх} = 4 \dots 20$ мА; $P_{вих} = 20 \dots 100$ кПа, Основна похибка 0,5%	ЕП-3211	—	«Пром-техсервіс» м. Київ	1 од.
5-3	Те саме	Те саме	Те саме	Щит керування	Прилад вторинний пневматичний показувальний реєструвальний, зі станцією керування (система СТАРТ); витрата повітря живлення $-6,5$ л/хв, $P_{жив} = 0,14$ МПа, $P_{вх} = 20 \dots 100$ кПа, Клас точності 0,5	ФК007 1	—	АТ«ТИЗ-ПРИБОР»	1 од.

Продовження додатка Б

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6-1	Оберти	Двигун центрифуги	13400 об/хв	Апарат 2	Електронний тахометр. Діапазон вимірювань 100...14000 об/хв, $U_{\text{живл}} = 8 - 24 \text{ В}$, похибка 1,5%	САР85 33	—	«Capelec» , Німеччин а	1 од.
6-2	Те саме	Те саме	Те саме	Щит керування	Регулятор кількості обертів Діапазон 100...14000 об/хв, $U_{\text{живл}} = 8 - 24 \text{ В}$, похибка 1,5%	DKG- 379	—	«DATAK О»М, м. Київ	1 од.
8-2	Те саме	Те саме	—	Щит керування	Самописний манометр $I_{\text{вх}} = 4...20 \text{ мА}$	МТС- 711	—	«Italmano metri», Італія	1 од.
ЕЛЕКТРОАПАРАТИ									
1-3	—	—	—	Місцевий	Підсилювач потужності аналоговий для керування електронагрівачем	У13Н	—	НВО «Електро термія», м. Луцьк	1 од.

Продовження додатка Б

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
МП1	—	—	—	Місцевий	Пускач магнітний безконтактний нереверсивний з реле IP-20; $I_{вх}$ = 160 А	ПМ 12- 01025	—	ВО «Електро прибор»	1 од.
SB1	—	Двигун М1	—	Щит керування	Пост керування кнопковий, номінальна робоча напруга 220 В	ПКУ- 123-11	—	ЗАТ «Промене ргоавтом атика», м. Київ	1 од.