

КОМПАНИЯ "СИНТОЛ" – ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОТ "А" ДО "Я"

Рассказывают научный директор компании "СИНТОЛ" Яков Игоревич Алексеев и заведующий сектором Института аналитического приборостроения РАН Дмитрий Григорьевич Петров



Я.И.Алексеев



Д.Г.Петров

С момента своего основания в 1997 году научно-производственная компания "СИНТОЛ" специализируется в сфере современных технологий синтеза и анализа нуклеиновых кислот.

К числу наиболее эффективных, высокоточных и широко распространенных методов анализа нуклеиновых кислот относятся полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и фрагментный анализ. Сотрудники НПФ "СИНТОЛ" впервые в России в промышленном масштабе наладили производство олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов для ПЦР в реальном времени, сделав этот метод доступным тысячам российских исследователей и врачей клинической лабораторной диагностики. Помимо олигонуклеотидов, компания предлагает сегодня также готовые ПЦР-смеси и наборы реагентов для ПЦР-диагностики, например для диагностики туберкулеза, особо опасных инфекций, для анализа ГМО (генетически модифицированных организмов), выявления патогенов растений, определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) человека и животных.

Совместно с Институтом аналитического приборостроения (ИАП) РАН и МГТУ им. Н.Э.Баумана были разработаны амплификаторы "АНК-32" и "АНК-48". А в 2015 году совместными усилиями ИАП РАН и НПФ "СИНТОЛ" был создан первый российский секвенатор "НАНОФОР-05". О наиболее перспективных решениях компании, представленных на выставке "Аналитика Экспо 2016", нам рассказали научный директор компании "СИНТОЛ" Яков Игоревич Алексеев и заведующий сектором Института аналитического приборостроения РАН Дмитрий Григорьевич Петров.

В основе научной и производственной деятельности компании "СИНТОЛ" лежит химический синтез ряда классов веществ. А насколько значимо для компании инструментальное направление?

Я.И.Алексеев: Действительно, базовый профиль деятельности компании "СИНТОЛ" связан с получением синтетических веществ, используемых в молекулярно-генетических исследованиях. Прежде всего это, конечно,

олигонуклеотиды, как обычные, так и модифицированные. Для удобства работы и экономии времени сотрудников научно-исследовательских лабораторий НПФ "СИНТОЛ" предлагает, помимо индивидуальных высокоочищенных соединений, готовые комплекты реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Они включают нуклеозидтрифосфаты, фермент ДНК-полимеразу, буфер и т.д.

Однако в гораздо большей степени, чем в научных изысканиях, индивидуальные реагенты и их наборы для молекуларно-генетических исследований используются для решения прикладных задач в отраслевых лабораториях - клинических, санитарно-эпидемиологических, пищевых, криминалистических и др. Это и диагностика заболеваний, например туберкулеза, особо опасных инфекций, идентификация лично-

сти, определение содержания ГМО в продуктах питания и т.д. В компании разработаны и производятся готовые тест-системы для проведения ПЦР-РВ. В частности, тест-системы для анализа генетически модифицированных организмов (ГМО) утверждены Роспотребнадзором* и используются в центрах гигиены и эпидемиологии, ветеринарных лабораториях, референтных центрах Россельхознадзора и других лабораториях.

Для быстрого обнаружения мутаций возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis complex*, приводящих к антибиотикоустойчивости, НПФ "СИНТОЛ" совместно с НИИ фтизиопульмонологии и Центральным НИИ туберкулеза разработал тест-системы "Амплитуб-МЛУ-РВ" и "Амплитуб-FQ-РВ". Они позволяют определять формы туберкулеза, устойчивые к антибиотикам первого и второго ряда (рифампицину, изониазиду, фторхинолонам). В настоящий момент тест-система "Амплитуб-МЛУ-РВ" уже успешно используется во многих противотуберкулезных диспансерах России, а применение там "Амплитуб-FQ-РВ" начнется, как только на эту тест-систему будет получено регистрационное удостоверение Минздрава России.

Реактивы и наборы реагентов производства "СИНТОЛ" отличаются высоким качеством, степенью очистки, многие из них уникальны. При этом они существенно дешевле зарубежных аналогов.

Но, как вы понимаете, для проведения генетических ана-

лизов, помимо реактивов, необходимо и качественное специализированное оборудование. В настоящее время мы предлагаем амплификаторы "АНК-32" и "АНК-48", секвенатор "НАНОФОР-05" и роботизированные станции. Эти приборы представляют собой системы "открытого типа" в отличие от большинства производи-

фикаторах и секвенаторе, хочу отметить, что в предложение компании входят не только эти приборы. Еще до выполнения ПЦР необходимо выделить ДНК/РНК из исследуемого образца. Для этого применяются микрочентрифуга "Циклотемп-901", термостат "Циклотемп-303", магнитные штативы и другое вспомога-

Наши амплификаторы "АНК", секвенатор "НАНОФОР-05" и роботизированные станции – системы "открытого типа"

мых за рубежом. Они позволяют использовать реагенты не только производства НПФ "СИНТОЛ", но и их аналоги других производителей. Все оборудование разработано в Институте аналитического приборостроения РАН при активном участии нашей компании и производится в России. Следует отметить, что оно успешно конкурирует с зарубежными аналогами не только по цене, но и по качеству, техническим параметрам, уровню сервиса. Так, в информационную поддержку наших клиентов входят, помимо консультаций, разработка тест-систем, секвенирование образцов, анализ и интерпретация полученных результатов.

Расскажите подробнее о предлагаемом вами оборудовании.

Д.Г.Петров: Прежде чем я перейду к рассказу об ампли-

тельное оборудование. Но при большом количестве образцов удобно использовать автоматизированные станции для выделения нуклеиновых кислот. Такая картриджная автоматизированная система для выделения ДНК/РНК также производится Институтом аналитического приборостроения РАН.

Следующая стадия – амплификация, т.е. увеличение числа копий целевых фрагментов исследуемой ДНК в процессе полимеразной цепной реакции. Причем ПЦР в реальном времени позволяет провести не только качественный, но и количественный анализ.

Амплификаторами "АНК" ИАП РАН занимается с середины 2000-х годов. Патент на первый из них, "АНК-16", был получен нами еще в 2004 году. Этот прибор позволял работать с 16 образцами одновременно (отсюда и

* МУК 4.2.2304-07 и МР № 02.008-06.

название – Анализатор Нуклеиновых Кислот – "АНК-16"). Позже появился "АНК-32", сейчас выпущен "АНК-48". Прибор состоит из теплового и оптического блоков и управляется с помощью встроенного компьютера, оснащенного сенсорным экраном. Тепловой блок, разработанный в сотрудничестве с МГТУ им. Н.Э.Баумана, содержит соответственно 32 или 48 лунок для пробирок объемом 0,2 мл. Внутри него по заданной программе происходит циклическое изменение температуры в интервале от 4 до 99 °С. В процессе анализа двойная спираль ДНК денатурирует при 95 °С, а образовавшиеся одноцепочечные нуклеиновые кислоты превращаются в матрицы, по которым фермент ДНК-полимераза при охлаждении достраивает комплементарные им цепи.

служит высокочувствительный фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Детекция флуоресценции происходит по 5–8 каналам. Наши амплификаторы могут использоваться в составе автоматизированных комплексов.

Если после проведения ПЦР исследователю требуется установить нуклеотидную последовательность в наработанных ампликонах, то сделать это он сможет с помощью секвенирования в генетическом анализаторе. К числу таких приборов относится первый российский секвенатор "НАНОФОР-05", который в 2015 году успешно прошел регистрацию в МинздравеРоссии**. Он представляет собой открытую автоматическую систему 8-калибрального электрофореза с 7-канальной детекцией лазер-индукционной флуоресценции. Прибор предназначен для разделе-

тически меченый флуоресцентным красителем.

Весь аналитический процесс полностью автоматизирован. Из планшета для проб образцы по заданной программе вводятся в капилляры, которые заполнены полимером для секвенирования и фрагментного анализа "ПДМА-6". Затем происходит электрофоретическое разделение. Для детекции флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в секвенаторе "НАНОФОР-05" применяется твердотельный лазер с длиной волны 488 нм. Его сфокусированное излучение, проходя через капилляр, вызывает флуоресцентный сигнал в диапазоне 520–710 нм, который в блоке спектрального анализа разлагается в спектр с помощью дифракционной решетки. Дальнейший анализ измеренной интенсивности производится с помощью специализированного ПО, установленного на компьютере. Время одного анализа занимает не более 1,5 ч, за которые с почти 100%-ной достоверностью могут быть разделены до 750 нуклеотидных фрагментов ДНК с шагом в один нуклеотид.

Я.И.Алексеев: Мы комплектуем "НАНОФОР-05" всем необходимым для проведения электрофореза и анализа нуклеотидной последовательности – буфером, полимером "ПДМА-6", спектральными калибраторами, маркерами молекуларного веса, наборами для секвенирования с терминаторами. Для криминалистических лабораторий – наборами для идентификации личности CORDIS (ООО "ГОРДИЗ", Россия). Однако

Все основные виды генетического анализа доступны секвенатору "НАНОФОР-05" в полном объеме

В ходе ферментативного синтеза происходит расщепление флуоресцентного зонда, освобождение флуорофора от связи с гасителем флуоресценции и увеличение флуоресцентного сигнала, регистрируемого прибором. Амплификатор "АНК" быстрый: 40 циклов ПЦР проходят примерно за 1 ч. В оптическом блоке в качестве источника света используется светодиод, а детектором

ния наработанной в процессе ПЦР смеси олигонуклеотидов, отличающихся друг от друга по длине на один концевой нуклеотидный остаток, спец-

* Многоканальный капиллярный генетический анализатор : пат. на полезную модель № 132203, Рос. Федерация; заявл. 11.10.2012; опубл. 10.09.2013.

** Регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2015/3474 от 23 декабря 2015 г.

"НАНОФОР-05" позволяет работать не только с нашими реагентами, но и с приобретенными у других производителей, как российских, так и зарубежных. Именно поэтому мы называем систему открытой. Насколько это важно для пользователей, легко понять, если учесть, что стоимость расходных материалов для зарубежных секвенаторов может составлять до 80% цены прибора ежегодно. А замена их другими, более дешевыми, затруднительна в силу защиты фирменных реагентов RFID-метками. Компания "СИНТОЛ" от такого ограничения сознательно отказалась, доказывая привлекательность своей продукции сочетанием высокого качества и стоимости, которая в 5-10 раз ниже предлагаемой конкурентами.

Можно ли использовать "НАНОФОР-05" для полной расшифровки генома?

Я.А.: Можно, но для небольших геномов, например вирусных. Секвенатор "НАНОФОР-05" относится к первому поколению приборов сенгеровского типа, которые могут быть использованы во всех видах геномных исследований. Именно на секвенаторах такого типа в 2003 году производилась полная расшифровка генома человека, хотя это потребовало очень больших временных затрат. Поэтому все основные виды генетического анализа доступны "НАНОФОР-05" в полном объеме. С его помощью можно проводить и секвенирование de novo, и ресеквенирование, и различные виды фрагментного анализа, включая микросателлитный анализ, множественную лигаз-

ную реакцию (MLPA), анализ потери гетерозиготности (LOH), анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов (AFLP), исследование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и т.д.

В частности, для идентификации личности, определения генетического родства

используются криминалистическими лабораториями.

В последние 3-4 года все большее распространение получают секвенаторы второго поколения, так называемые NGS (next generation sequencing). На некоторых NGS-секвенаторах определение нуклеотидной последователь-

За приборами NGS-секвенирования будущее, и мы активно ведем работы в этом направлении

используется исследование STR-локусов - коротких tandemных повторов, состоящих из следующих друг за другом повторяющихся нуклеотидных звеньев с некоторой общей последовательностью и длиной от 3 до 5 нуклеотидов. Хотя они составляют менее 10% всей молекулы ДНК, однако их исследование позволяет с очень высокой степенью достоверности (более 99,9%) индивидуализировать образец нукleinовой кислоты, определить ее уникальность и происхождение. Это очень востребованный сегодня вид анализа. Поэтому в комплект "НАНОФОР-05" для криминалистических лабораторий входят наборы, разработанные российской биотехнологической компанией "ГОРДИЗ". Они включают реагенты для мультиплексного анализа 19 STR-маркеров и локуса амелогенина человека, успешно конкурируют с зарубежными аналогами и широко

ности не требует предварительной амплификации и позволяет обходиться практически одной-единственной молекулой нукleinовой кислоты. Секвенаторы второго поколения проводят анализ существенно быстрее и имеют более высокую чувствительность. Переход на NGS-секвенаторы для выполнения генетических исследований делает реальным создание генетического паспорта каждого человека. Приборы второго поколения уже используются в диагностике онкологических и наследственных заболеваний, в том числе в преимплантационной и пренатальной. Так что за приборами NGS-секвенирования будущее. На их разработку требуются большие средства и время, но мы активно ведем работы в этом направлении.

Спасибо за интересный рассказ.
С Я.Алексеевым и Д.Петровым
беседовал К.Гордеев