DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar76918>

Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО «Синтол»

© В.Е. Курочкин¹, Я.И. Алексеев², Д.Г. Петров¹, А.А. Евстапов¹¹ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия;² ООО «Синтол», Москва, Россия

Разработана линейка отечественных приборов и наборов реагентов для молекулярно-генетического анализа, обеспечивающая проведение всех этапов исследования от автоматизированного выделения препаратов нуклеиновых кислот, их амплификации с детекцией в реальном времени до классического и полногеномного секвенирования ДНК. С помощью созданного оборудования и наборов реагентов успешно реализованы подходы для специфической индикации возбудителей широкого спектра заболеваний. Высокая эффективность предложенных подходов показана на примере выявления и анализа РНК возбудителя коронавируса SARS-CoV-2 в борьбе с пандемией коронавируса COVID-19 (7 рис., библиография: 4 источника).

Ключевые слова: автоматизация; молекулярно-генетический анализ; нуклеиновая кислота; секвенирование.

Как цитировать:

Курочкин В.Е., Алексеев Я.И., Петров Д.Г., Евстапов А.А. Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО «Синтол» // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2021. Т. 40. № 3. С. 69–74. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar76918>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar76918>

Domestic devices for molecular genetic analysis: developments of the IAP RAS and SINTOL LLC

© Vladimir E. Kurochkin¹, Yakov I. Alekseev², Dmitriy G. Petrov¹, Anatoliy A. Evstrapov¹¹ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;² "Syntol" LLC, Moscow, Russia

The set of domestic devices and reagent kits for molecular genetic analysis has been developed, which provides for all stages of the study, from the automated isolation of nucleic acids, their amplification with real-time detection to classical and genome-wide DNA sequencing. With the help of the created equipment and reagent kits, approaches for the specific indication of pathogens of a wide range of diseases have been successfully implemented. The high efficiency of the proposed approaches is shown by the example of detecting and analyzing the RNA of the pathogen SARS-CoV-2 in the fight against the COVID-19 coronavirus pandemic (7 figs, bibliography: 4 refs).

Keywords: automation; molecular genetic analysis; nucleic acid; sequencing.

To cite this article:

Kurochkin VE, Alekseev YI, Petrov DG, Evstrapov AA. Domestic devices for molecular genetic analysis: developments of the IAP RAS and SINTOL LLC. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2021;40(3):69–74. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar76918>

Received: 13.07.2021

Accepted: 28.07.2021

Published: 10.08.2021

Многие приборостроительные фирмы и компании уделяют особое внимание созданию и развитию автоматизированных систем для безопасного анализа биологических проб. В первую очередь это касается систем пробоподготовки потенциально опасных биологических образцов. Одним из перспективных решений является использование специализированных картриджей, оснащенных необходимыми реагентами для выделения и концентрирования нуклеиновых кислот. Они представляют собой герметичную, закрытую конструкцию, предотвращающую контаминацию образца и его контакт с окружающей средой. Выделенный из пробы продукт, который уже не является потенциально опасным, собирается в стандартные микропробирки для последующего анализа методами полимеразной цепной реакции, изотермической амплификации, секвенирования и другими.

В Институте аналитического приборостроения ведутся работы по созданию автоматизированных систем пробоподготовки и анализа биологических образцов. В разработках применяется идеология использования одноразовых полимерных картриджей, обеспечивающих возможность герметичных манипуляций с биологической пробой. Разработан и производится по заказам комплект молекулярно-биологических тест-систем, реактивов и аналитических приборов для выявления, идентификации и генетического типирования возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний. Составляющими этого комплекта являются: комплекс для выделения нуклеиновых кислот (КВНК) (рис. 1), прибор АНК-32 для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [1] (рис. 2) и прибор НАНОФОР 05 [2] для генетического типирования возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы (рис. 3).

Комплекс КВНК с помощью одноразовых картриджей обеспечивает четырехканальное автоматическое выделение нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб окружающей среды, осуществляет инактивацию возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, удаляет из проб примеси, ингибирующие ПЦР-РВ. Использование одноразовых картриджей позволяет ускорить, упростить и повысить безопасность работ с биологическими пробами в стационарных и передвижных микробиологических и медицинских лабораториях при проведении генетических исследований. Комплекс КВНК обеспечивает высокоэффективное выделение нуклеиновых кислот в автоматическом режиме под управлением программ, хранящихся в постоянном запоминающем устройстве комплекса (до 10 базовых программ). Кроме этого, пользователь может создавать новые алгоритмы выделения нуклеиновых кислот за счет корректировки базовых программ.

Выделенные нуклеиновые кислоты затем могут быть проанализированы на приборах АНК-32, НАНОФОР 05 и НАНОФОР СПС.

Рис. 1. Комплекс для выделения нуклеиновых кислот КВНК

Рис. 2. Анализатор нуклеиновых кислот АНК-32

Рис. 3. Генетический анализатор НАНОФОР® 05

Анализаторы нуклеиновых кислот (АНК) предназначены для обнаружения и измерения исходного количества искомой ДНК (РНК) в исследуемом образце в динамическом диапазоне от единичных до 10^9 копий. АНК-32 позволяет решать задачи: а) клинической диагностики социально значимых заболеваний, а именно выявление и оценка эффективности лечения СПИДа, вирусных гепатитов, устойчивости штаммов туберкулеза и др.; б) эпидемиологии — выявление возбудителей особо опасных заболеваний: коронавируса, сибирской язвы, вируса Эбола, чумы, холеры, оспы и многих др.; в) сельскохозяйственной, ветеринарной и пищевой промышленности — выявление и количественная оценка ДНК генетически модифицированных организмов, маркер вспомогательной селекции новых пород животных и сортов растений, фальсификации продуктов питания; г) криминалистики — определение наличия и количества ДНК человека, а также группы крови, резус-фактора и многих фенотипических признаков. Особенности

Рис. 4. Полногеномный секвенатор ДНК НАНОФОР СПС

АНК-32: возможность использования в составе мобильных лабораторий и анализа до 5 различных мишеней в одной пробирке одновременно.

Генетический анализатор НАНОФОР 05 предназначен для автоматической расшифровки последовательности ДНК (секвенирование) и ее фрагментного анализа (генетическое типирование). Анализатор НАНОФОР 05 — прибор капиллярного электрофореза, способный работать в автоматическом режиме 24 ч в сут. Он позволяет проводить анализ 96 образцов, измеряя параллельно в 8 капиллярах сигнал флуоресценции от 4 до 8 красителей, излучающих в спектральном диапазоне от 520 до 710 нм. Области применения анализатора: персонализированная медицина, санитарно-эпидемиологический контроль, сельское хозяйство, криминалистика, биотехнология, фундаментальные научные исследования.

Прибор для массового параллельного секвенирования ДНК НАНОФОР СПС (рис. 4) предназначен для секвенирования полных геномов вирусов, микроорганизмов, а также панелей генов. Он содержит одну проточную ячейку и обеспечивает возможность парноконцевого прочтения с максимальной длиной 250 нуклеотидов. За один цикл исследования прочитывается не менее 7,5 млрд нуклеотидов за время не более 40 ч.

Мировой опыт борьбы с распространением COVID-19 со всей очевидностью показал, что наибольшая эффективность противодействия этому заболеванию, отличающемуся высокой вирулентностью, контагиозностью, а также способностью мутировать, достигается за счет комплекса противоэпидемических мер, одним из важнейших в котором является быстрый, высокоспецифический и всесторонний молекулярно-генетический анализ возбудителя.

При решении задачи быстрой специфической индикации коронавируса COVID-19 наиболее эффективными оказались методы молекулярно-генетического анализа, прежде всего секвенирование ДНК, благодаря которому был оперативно расшифрован геном коронавируса SARS-CoV-2 [3] а также совмещенные в одной пробирке реакция обратной транскрипции и полимеразная

цепная реакция в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) [4]. Именно ОТ-ПЦР-РВ стал основным, наиболее эффективным методом, по сути, остановившим распространение пандемии, благодаря тому что своевременно диагностированные с положительным результатом теста на коронавирус пациенты, изолированные в специализированные условия для наблюдения и лечения, не представляли угрозы по дальнейшему распространению возбудителя.

Исследование на коронавирус является многостадийным процессом. На первом этапе у пациента берут мазок из носо- и/или ротоглотки и помещают его в транспортную среду. Затем происходит выделение препарата нуклеиновых кислот методом их обратимой сорбции-десорбции на подложку (чаще всего покрытые силикой магнитные частицы). После этого проводится выявление РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ. В случае положительного результата анализа (обнаружения специфического фрагмента(ов) РНК возбудителя) проводится более детальный молекулярно-генетический анализ путем классического или полногеномного секвенирования. На каждом этапе исследования кроме забора пробы используются специализированное оборудование и наборы реагентов.

Так, с помощью компонентов набора реагентов «М-Сорб-НК» (ООО «Синтол»), заправленных в картридж, проведено выделение РНК SARS-CoV-2 на приборе КВНК. Выявление РНК SARS-CoV-2 было проведено на приборе АНК-32 с использованием набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» (ООО «Синтол») (рис. 5). Время выделения и специфической индикации составило менее 2 ч.

При этом показано, что эффективность выделения ручным методом и на приборе БВНК оказалась сопоставима как по времени выделения — 30 мин, так и по количеству и чистоте выделенного генетического материала. Выделенная РНК SARS-CoV-2 была превращена в кДНК с использованием набора реагентов для обратной транскрипции «ОТ-1» (ООО «Синтол»). Фрагменты кДНК, соответствующие гену, кодирующему S белок оболочки коронавируса, были амплифицированы с использованием пар праймеров для генотипирования гена S белка. Секвенирование полученных ампликонов было проведено на приборе НАНОФОР 05 и показало отсутствие мутаций, характерных для британского, южноафриканского, бразильского и индийского штаммов коронавируса (рис. 6). Полное время исследования от получения образца до получения результата секвенирования ДНК составило менее 8 ч.

Полученный препарат кДНК также был использован для подготовки библиотеки ампликонов для секвенирования полного генома коронавируса. Для этого использовался набор реагентов «SARS-CoV-2 полный геном» (ООО «Синтол»). Секвенирование проводили

Рис. 5. Положительный результат анализа на выявление РНК SARS-CoV-2, полученный на приборе АНК-32

Рис. 6. Фрагменты электрофореграммы, полученной на приборе НАНОФОР 05, соответствующие участкам гена, кодирующего S белок коронавируса SARS-CoV-2, замены CTG на CGG (S:L452R) (a) и GAA на CAA (S:E484Q) (b) в которых характерны для «индийского» штамма коронавируса

Рис. 7. Фрагменты двух расшифрованных геномов SARS-CoV-2, содержащие замены относительно референсного генома NCBI

на приборе НАНОФОР СПС. Найденные в результате сборки полного генома замены приведены на рис. 7. Время полного цикла полногеномного исследования составило 48 ч.

Таким образом, с помощью разработанного отечественного оборудования успешно реализованы подходы для специфической индикации возбудителей широкого спектра заболеваний. Высокая эффективность разработанных подходов показана на примере выявления и анализа РНК возбудителя коронавируса SARS-CoV-2 в борьбе с пандемией коронавируса COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136.
2. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Малюченко О.П., и др. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК // Научное приборостроение. 2012. Т. 22 (4). С. 86–92.

REFERENCES

1. Alekseev Yal, Belov YuV, Varlamov DA, et al. Devices for diagnostics of biological objects based on the method of polymerase chain reaction in real time (PCR-RT). *Scientific Instrument Engineering*. 2006;16(3):132–136. (In Russ.)
2. Alekseev Yal, Belov YuV, Malyuchenko OP, et al. Genetic analyzer for DNA fragment analysis. *Scientific Instrument Making*. 2012;22(4):86–92. (In Russ.)

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова».

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

3. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. Доступен по: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512 (дата обращения 13.05.2021).
4. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., и др. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // Биомика. 2020. Т. 12, № 1. С. 121–179.

3. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512 (accessed 13.05.2021).
4. Garafutdinov RR, Mavzyutov AR, Alekseev Yal, et al. Betacoronaviruses of humans and their highly sensitive detection using PCR and other methods of amplification. *Biomics*. 2020;12 (1):121–179. (In Russ.)

ОБ АВТОРАХ

Владимир Ефимович Курочкин, докт. технич. наук, профессор; Web of Science Researcher ID: 20: S-7871-2016; eLibrary SPIN: 1868-9326; AuthorID: 22692; e-mail: lavrovvas@yandex.ru

Яков Игоревич Алексеев, канд. биол. наук; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1696-7684>; eLibrary SPIN: 8145-5586; Web of Science Researcher ID: 20: ABF-1452-2020; AuthorID: 161130; e-mail: jalex01@mail.ru

Дмитрий Григорьевич Петров; eLibrary SPIN: 2975-8180; AuthorID: 761722; e-mail: dimoon88@mail.ru

***Анатолий Александрович Евстапов**, докт. технич. наук; адрес: Россия, 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4495-8096>; eLibrary SPIN: 2053-5020; Web of Science Researcher ID: 20: I-9739-2014; AuthorID: 22691; e-mail: an_evs@mail.ru

AUTHORS INFO

Vladimir E. Kurochkin, D.Sc. (Technical), Professor; Web of Science Researcher ID: 20: S-7871-2016; eLibrary SPIN: 1868-9326; AuthorID: 22692; e-mail: lavrovvas@yandex.ru

Yakov I. Alekseev, Ph.D. (Biology); ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1696-7684>; eLibrary SPIN: 8145-5586; Web of Science Researcher ID: 20: ABF-1452-2020; AuthorID: 161130; e-mail: jalex01@mail.ru

Dmitriy G. Petrov; eLibrary SPIN: 2975-8180; AuthorID: 761722; e-mail: dimoon88@mail.ru

***Anatoliy A. Evstrapov**, D.Sc. (Technical); address: 26, Rizhskiy ave., Saint Petersburg, 190103, Russia; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4495-8096>; eLibrary SPIN: 2053-5020; Web of Science Researcher ID: 20: I-9739-2014; AuthorID: 22691; e-mail: an_evs@mail.ru