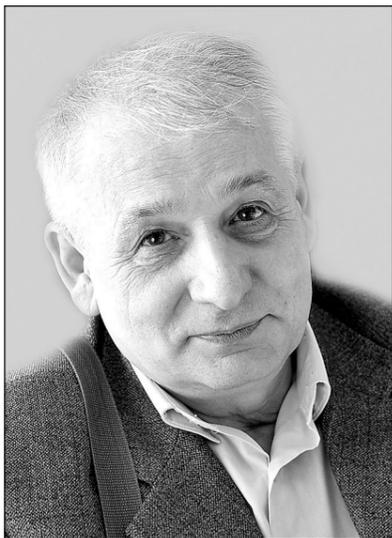


# Фабрика генов — полезная вещь!

На одном из мартовских заседаний Президиума СО РАН заведующий лабораторией медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины к.х.н. **А.Н. СИНЯКОВ** представил научный доклад по теме «Технологическая платформа для синтетической биологии». Речь шла о возможностях, которые дает учёным синтез генов, о биомедицинских исследованиях и развитии биотехнологий, а также о тех работах, которые ведутся в ИХБФМ по созданию микрочипового синтезатора ДНК. Об этом — наш сегодняшний разговор.



— Александр Николаевич, первый вопрос человека несведущего — для чего все это нужно?

— Установки, с которыми мы работаем, нужны, прежде всего, для генетической инженерии или молекулярной биологии. А именно — для диагностики, выявления патологий, мутаций, для определения патогенов. В настоящее время происходит становление новой междисциплинарной науки, которая основана на создании искусственных живых систем, использующих искусственные гены — синтетической биологии. Её развитие осуществляется на базе революционного прорыва в области синтеза генов, связанного с разработкой микрочиповых реакторов, которые позволяют синтезировать одновременно до нескольких сотен тысяч олигонуклеотидов (именно из них собирают фрагменты геномов).

— Тогда чуть подробнее — что из себя представляет синтез генов, какова технология, как происходит работа? Словом, популярно о собственно научных исследованиях.

— Если вы пройдёте по нашим лабораториям, то увидите несколько автоматических синтезаторов ДНК. В небольших колонках, заполненных пористой окисью кремния, этот прибор, управляемый компьютером, синтезирует относительно короткие, в несколько десятков оснований, фрагменты ДНК — олигонуклеотиды, которые представляют собой, так сказать, «кирпичики» для исследований в молекулярной биологии.

Мы делаем много таких олигонуклеотидов, использующихся для создания более сложных продуктов, в частности, для диагностики. Например, мы производим диагностические чипы — на небольшой стеклянной «подушке» размещаем фрагменты ДНК, так называемые олигонуклеотидные зонды, с помощью которых типировать патогены.

Работы по синтезу искусственной ДНК ведутся на трёх синтезаторах, которые в сумме могут дать в сутки максимум 200—300 олигонуклеотидов разного состава. А наука сейчас развивается стремительно, и потребности в олигонуклеотидах самого разного состава резко возрастают (кстати, возможности исследователей — тоже). И если современный прибор станет синтезировать их в количестве не десятков, а сотен тысяч, если учёные будут иметь очень много дешёвых и доступных олигонуклеотидов, тогда уже появится возможность переходить к искусственному синтезу живого, а именно — геномов различных организмов. Именно такая задача ставится перед исследователями сегодня.

— И что уже сделано? Как обстоят дела с синтезом геномов в мире?

— Уже синтезированы простейшие геномы. Первым был полиовирус — его в 2002 году синтезировал Экард Виммер с сотрудниками. Геном полиовируса составляет ~ 7500 нуклеотидов. Потом синтезировали фаг, паразитирующий на кишечной палочке *E. coli*. И вершина синтеза искусственных геномов — работа Грега Вентера, синтезировавшего геном искусственной бактерии: он внедрил искусственный геном одного типа бактерии в оболочку другого. В результате функционирования искусственного генома бактерия

изменила тип своей первоначальной оболочки и стала неотличима от бактерий с аналогичным геномом. Для реализации этого проекта потребовалось синтезировать более одного миллиона пар нуклеотидов. Это чрезвычайно сложная и трудоёмкая работа.

Мы пытаемся создать автоматы — приборы, которые будут помогать исследователю конструировать искусственные геномы. Впрочем, на первом этапе не стоит стремиться к синтезу очень сложных геномов — лучше действовать поэтапно, например, создать фабрику генов, полезных для людей. Так, ряд важных белков, например, интерферон, являющийся неспецифическим противовирусным средством, можно заставить производить специальные бактерии, в геном которых встроен искусственный ген. Такой метод гораздо проще, чем выделять интерферон из донорской крови. Спектр целевых генов очень широк — это и антигены патогенов, нужные для диагностики, и гены, кодирующие медиаторы клеточного иммунитета, и генетические конструкции, необходимые для конструирования живых вакцин. В общем, фабрика генов — очень полезная вещь. Так что пока хотели бы остановиться на первом этапе — конструирования множества полезных генов.

Чтобы наглядно продемонстрировать всё, о чём говорил, Александр Николаевич подходит к лабораторному столу и возвращается, держа в руках чашку Петри с какими-то фрагментами, кусочками, пластинками (а на них — линии, геометрические фигуры — определить сможет только специалист), и продолжает...

— Это кремниевый чип микрочипового синтезатора ДНК. На его поверхности теоретически можно синтезировать 20 тысяч олигонуклеотидов разного состава. Мы тренируемся на этом чипе, ячейки которого вы ещё можете увидеть глазом — их пока здесь меньше двухсот. Нужно научиться в эти ячейки осаждать окись кремния, потом «привязывать» первое звено будущего олигонуклеотида, а после этого в каждой ячейке синтезировать отдельно разного состава олигонуклеотиды.

Но после синтеза олигонуклеотидов в нашем деле ещё ничего не кончается. Если вы хотите что-то синтезировать, например, фрагмент генома или сам геном живого микроорганизма, надо научиться эти олигонуклеотиды правильно сшивать в целевую последовательность. Дело в том, что при синтезе неизбежно возникает какое-то количество ошибок, и их нужно будет специальными ферментами исправить. Как только начинаешь чем-то реальным заниматься, тут и возникает миллион проблем, которые необходимо решать.

— С виду такая ювелирная работа — страшно подумать. Но у вас уже, наверное, рука набита. Как вообще справляетесь?

— Мы, конечно, делаем это не одним своим коллективом, а совместными усилиями в рамках интеграционных проектов. Учитывая важность развития синтетической биологии, в Сибирском отделении РАН организован консорциум из нескольких институтов (ИАиЭ, ИФП, ИХБФМ, НИОХ и ИТПМ) для создания микрочипового синтезатора олигонуклеотидов. Я сейчас являюсь координатором этого проекта. Работа носит междисциплинарный характер, включает разработку химических реагентов, фотохимических способов управления реакцией наращивания олигонуклеотидной цепи, изготовления микрочипа-реактора, разработку методов синтеза генов.

Для успешного выполнения проекта нужны знания физиков по осаждению окиси кремния в реакционные ячейки микрочипа, технологии фотолитографии, для формирования подводящих и отводящих каналов реагентов микрочипа — технологии сращивания кварцевого стекла и кремния, словом, много разных больших и малых задач. Они иногда не потрясают воображение, но если ошибёшься хотя бы в одном, у вас не получится ничего.

Сами кремниевые чипы делаются в Институте физики полупроводников с использованием метода фотолитографии. Там же в ячейке осаждают окись кремния из газовой фазы, плазмой обрабатывают каналы, чтобы в них не шёл параллельный побочный синтез олигонуклеотидов. А то, что передаём,

заготовка, исходный чип для синтеза. Чтобы на нём проводить реакции, нужно владеть химией олигонуклеотидного синтеза: это хорошо отработано в ИХБФМ, и практически всю технологию мы переносим сюда. За одним исключением.

В наших традиционных автоматах по синтезу олигонуклеотидов на определенной стадии происходит добавление в реакционные колонки кислоты и деблокирование временной защитной группы растущего олигонуклеотида. Размеры же ячейки чипа для синтеза олигонуклеотидов очень маленькие, и мы не можем в этом случае полностью использовать имеющуюся технологию традиционных синтезаторов, поэтому для деблокирования защитной группы при микрочиповом синтезе применяем фотогенерируемые кислоты. Вот их-то для нас делают в Новосибирском институте органической химии. Причем не просто какую-то одну — надо найти наиболее подходящую по параметрам. НИОХ СО РАН синтезирует ряд генераторов фотоактивных кислот, образующих кислоты либо под воздействием дальнего ультрафиолета, либо ближнего видимого света.

Следующая часть — это уже сам макет, сложное технологическое устройство. В каждой ячейке микрочипа синтезируется свой олигонуклеотид заранее выбранного состава, для чего в определенные моменты синтеза нужно направлять в определенные ячейки микрочипа лучи света для деблокирования защитных групп. Для этих целей внутри нашего макета есть управляемые микроскопические зеркала, всего их свыше 800 тысяч штук. Они очень маленькие, примерно 12 микрон, и должны освещать строго определённый участок микрочипа. Это очень тонкая работа, и выполняется она четвёртым участником проекта — Институтом автоматизации и электротехники.

Работу по оптимизации гидродинамики микрочипа выполнил пятый участник нашего проекта — ИТПМ СО РАН.

В результате работы микрочипового синтезатора мы получаем считанное количество целевых молекул олигонуклеотидов (100—1000 штук). Чтобы получить нужную генную конструкцию, мы обладаем такой прекрасной технологией, которая называется полимеразная цепная реакция (ПЦР). С её помощью небольшое количество целевого продукта мы можем размножить во много раз. ПЦР даёт также возможность манипулировать с материалом, т.е. делать самые разные конструкции, встраивать их в различные векторы, получать гибридные бактерии, вирусы, продуценты, скажем, кишечной палочки. Фактически, чем отличается химия от биологии — в химии вещество можно только расходовать, а в биологии — ещё и размножать. Так что, сделав фрагмент генома, мы можем его «клонировать», если не потеряем.

— Давно ли вы работаете в области микрочипового синтеза генов?

— Синтезом искусственных генов мы начали заниматься 30 лет назад, в 2002 году заинтересовались биологическими микрочипами для диагностики, а примерно год три назад получили первый интеграционный проект для создания микрочипового синтезатора ДНК и приступили к основам того, чего в стране ещё не было — новой науки синтетической биологии.

Сейчас микрочиповые синтезаторы существуют только на Западе, где они появились тоже не так давно. Поскольку такая техника открывает возможность реализации принципиально новых подходов к созданию биологического оружия, ценных продуктов для промышленности, медицины и сельского хозяйства, несомненно, следует ожидать ограничений на экспорт современных синтезаторов олигонуклеотидов в нашу страну.

Практические действия по ограничению распространения этой технологии уже предпринимаются. В декабре 2006 рядом крупных международных компаний и исследовательских центров США принят документ «Практические перспективы синтеза ДНК и биологическая опасность», в котором предлагается практический план по тщательному контролю за химическим синтезом ДНК в компаниях профиля синтетической биологии. Компании, осуществляющие синтез ДНК и работающие в области синтетической биологии, находятся в тесном сотрудничестве с правительственными агентствами и передают им информа-

цию о потенциально опасных заказах.

В этих условиях трудно ожидать сохранения коммерческой тайны и невозможно проводить закрытые исследования оборонного характера. Данная концепция работ получила одобрение ФБР и ряда правительственных агентств США. Есть лишь несколько фирм в Америке, Англии и Германии, которые принимают заказы на изготовление смесей олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых синтезаторах, и заказы эти тщательно анализируются с помощью компьютеров. Кроме того, заказчик должен объяснить, для чего ему эти олигонуклеотиды нужны.

— Такой подход не тормозит науку?

— Скорее даже не науку, а технологическое развитие страны. Получается, что одни страны могут использовать высокопродуктивное оборудование, которое позволяет им дешёво и быстро получать какие-то продукты, а другие не имеют доступа к этому. Ведь на таких условиях вы никогда не сможете защитить свою коммерческую тайну, вести закрытые исследования без того, чтобы вторая сторона не знала, что вы хотите сделать. За две недели высокопроизводительные компьютеры проанализируют состав вашего заказа, сравняв с известными микроорганизмами, а потом дадут заключение об истинных целях исследования.

Ну а если вернуться к нашему проекту... Задача, над которой в настоящее время мы работаем, очень сложная: нет ни одной проблемы, которую бы решили сразу. Необходимо овладеть современными вариантами фотолитографии, научиться микромеханике, которая на Западе уже ушла далеко вперёд, нужно доработать химию. Сейчас, поскольку макет уже есть, мы хотели бы наполнить его содержанием, «научить» его эффективно и правильно работать, перейти от стадии крупных ячеек микрочипа к относительно небольшому. Это позволит значительно увеличить число синтезируемых на чипе олигонуклеотидов.

— И всё-таки чего в ваших работах больше — фундаментальной или прикладной науки? Что будет потом?

— Мы создаём инструментарий для фундаментальной науки, в частности, для современной биологии, но не забываем и о прикладных аспектах. Вот видите это стекло — оно прозрачное, слегка жёлтое; на таких стеклянных подложках мы печатаем чипы. Данный чип содержит 64 точки и может в большинстве случаев выявить генно-модифицированные продукты в вашей еде. У нас имеется такой проект — анализ генно-модифицированных продуктов, который финансируется Украиной. Когда мы научимся синтезировать на чипе не десятки, сотни, а до двадцати тысяч олигонуклеотидов, получим мощное устройство для диагностических целей. В этом случае анализируемую пробу можно поместить непосредственно в микрочип и сразу проанализировать её состав. Если правильно рассчитаем состав типированных зондов, полученный микрочип будет выявлять наследственные заболевания, генно-модифицированные продукты, либо типировать любые заболевания.

Подобный чип может служить для двух направлений — либо диагностического, для выявления болезней, либо для синтеза смесей олигонуклеотидов и конструирования фрагментов генома. Таким образом, мы пытаемся «научить» наш микрочиповый синтезатор производить наборы большого числа олигонуклеотидов для нужд синтетической биологии, а также использовать микрочипы с неотщеплёнными олигонуклеотидами непосредственно для диагностики заболеваний и патологий.

Мы также пытаемся наладить потребление чипов, которые будем синтезировать — здесь тоже не всё просто. К сожалению, в нашей стране если не внедришь то, что придумал, изобрел, создал, никто за тебя не сделает. Сейчас по предложению академика В.В. Власова готовим конференцию по синтетической биологии, собираемся пригласить учёных, которые умеют делать гены из микрочиповых олигонуклеотидов — чтобы наладить связи, сжечь время и деньги для изысканий. И всё это — естественный путь развития исследований.

Ю. Александрова, «НВС»  
Фото В. Новикова