

*На правах рукописи*

ПЕРШИНА АЛЕКСАНДРА ГЕННАДЬЕВНА



**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА И  
МОЛЕКУЛ ДНК IN VITRO**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный руководитель:

**д.м.н. Сазонов Алексей Эдуардович**

Официальные оппоненты:

**д.б.н., профессор Загребельный Станислав Николаевич**

**д.х.н., профессор Зарытова Валентина Филипповна**

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича  
РАМН

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 года в \_\_\_\_\_ часов \_\_\_\_\_ минут  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Бионаногибридные конструкции, содержащие магнитные наночастицы и молекулы нуклеиновых кислот, представляют огромный интерес для современной биомедицины, в том числе в области создания высокочувствительных систем количественного определения и идентификации фрагментов ДНК и РНК-молекул. Это связано с появлением у наночастиц уникальных магнитных свойств, обеспечивающих легкость управления и эффективность детектирования конструкций на их основе, сочетающего помехоустойчивость с возможностью обнаружения диагностически-значимых молекул в режиме реального времени. Нанометровые размеры конструкций позволяют выявлять единичные молекулы, что значительно увеличивает чувствительность анализа. Перспективность использования наночастиц на основе ферритов для создания биомедицинских конструкций обусловлена сочетанием высоких магнитных свойств, с большей устойчивостью к окислению и биологической инертностью по сравнению с наночастицами металлов. Раскрытие закономерностей взаимодействия нуклеиновых кислот и наночастиц является первоочередной задачей для развития теоретических и методических подходов к созданию бионанокompозитных конструкций. Это открывает перспективу управления связями компонентов конструкции, определяют область и границы ее биомедицинского использования. Актуальность исследования взаимодействия ферримагнитных наночастиц и молекул ДНК продиктована и тем, что лежит в основе воздействия наноматериалов на биосистемы, что напрямую связано с обеспечением безопасности и качества жизни человечества в целом. В литературе приводятся данные о высокой адсорбционной активности наночастиц оксидных ферримагнетиков относительно молекул ДНК, тем не менее механизмы их взаимодействия остаются малоизученными. Заключение о природе формирующихся связей носят противоречивый характер. Очевидно, что взаимодействие нуклеиновых кислот и магнитных наночастиц может реализовываться за счет нескольких механизмов с участием различных групп биомолекулы.

**Цель работы** изучить взаимодействие суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта, полученных методом механохимического синтеза, и нуклеиновых

кислот, на модели природных и синтетических одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК, *in vitro*.

### **Задачи исследования:**

1. Исследовать закономерности связывания природных и синтетических одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта при варьировании рН, ионной силы и химического состава среды;
2. Выявить группы молекул ДНК, участвующие во взаимодействии с наночастицами феррита кобальта;
3. Изучить сорбционные свойства и природу активных центров на поверхности частиц нанопорошка феррита кобальта с использованием модельных молекул;
4. Определить доступность молекулы ДНК, связанной с наночастицами феррита кобальта, для нуклеазного расщепления;
5. Оценить влияние связывания наночастиц феррита кобальта с молекулами ДНК на структуру и функцию биомолекулы;
6. Построить модель взаимодействия компонентов комплекса «ДНК–ферритмагнитная наночастица».

**Научная новизна работы.** Впервые показана способность наночастиц феррита кобальта, синтезированных методом механохимии, связываться с фрагментами природных и синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДНК с образованием стабильных комплексов. Определено, что эффективность связывания и стабильность комплексов при изменении параметров среды (рН, ионной силы, химического состава) зависят от нуклеотидного состава биомолекулы. Установлено, что связывание молекул ДНК и наночастиц реализуется за счет координации фосфатных групп сахарофосфатного остова и карбонильных групп оснований ДНК атомами переходных металлов на поверхности, и стабилизируется водородными связями. При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК связывание с поверхностью наночастицы могут вовлекаться атомы азота гетероциклического кольца. При взаимодействии с природными молекулами двухцепочечных ДНК наночастицы связываются преимущественно с GC-парами, защищая их от действия рестриктаз. Впервые показано, что в составе комплексов с

наночастицами феррита кобальта молекулы ДНК не деградированы и могут частично сохранять способность к гибридизации с комплементарными молекулами ДНК. Показана возможность высвобождения молекулы ДНК из комплекса с наночастицами, при этом функция биомолекулы восстанавливается. На основе полученных данных о взаимодействии наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК предложен метод создания и принципиальная схема оригинальной конструкции для выявления диагностически-значимых фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, при наложении внешнего магнитного поля.

**Теоретическое и практическое значение работы.** В работе продемонстрирована принципиальная возможность и перспективность использования суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта, синтезированных методом механохимии, для формирования магниточувствительных бионаноконструктивных структур. Полученные новые данные о закономерностях взаимодействия наночастиц феррита кобальта и молекул одноцепочечных и двухцепочечных дезоксирибонуклеиновых кислот будут положены в основу реализации подходов к бионаноконструированию при создании новых наноразмерных устройств. Подобные конструкции, созданные на основе суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК, являются перспективными структурами для разработки исследовательских и диагностических инструментов в области молекулярной биологии, медицины и наноэлектроники. Данные, представленные в работе, вносят существенный вклад в понимание механизмов взаимодействия неорганических наночастиц и молекул нуклеиновых кислот, что имеет большое значение для развития представлений о воздействии новых наноразмерных материалов на биологические системы.

**Апробация результатов исследования и публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Материалы, включенные в диссертацию, докладывались на всероссийских и международных конференциях, в том числе на 2ой международной конференция «Наноразмерные системы: строение свойства, технологии» НАНСИС-2007 (Киев, Украина, 2007), 2ой Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, Россия, 2008), International Conference on Materials for

Advanced Technologies ICMAT 2009 (Сингапур, 2009), Втором Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий в рамках 2го международного форума по нанотехнологиям «Руснанотех-2009» (Москва, Россия, 2009), Third International NanoBio Conference 2010, Zurich (Цюрих, Швейцария, 2010).

**Структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 166 страницах, иллюстрирована 40 рисунками и 6 таблицами. Библиография содержит 271 литературный источник.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Наночастицы феррита кобальта, синтезированные методом механохимии, связываются с молекулами природных и синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДНК и формируют стабильные комплексы. Эффективность связывания и стабильность комплексов при изменении химического состава среды зависит от нуклеотидного состава биомолекулы, и может значительно снижаться в присутствии молекул, конкурирующих за центры координационного связывания на поверхности.

2. Взаимодействие молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта реализуется за счет координации групп оснований и фосфатных групп остова ДНК на поверхности наночастицы и стабилизируется водородными связями. При связывании с природными молекулами двухцепочечных ДНК наночастицы феррита кобальта взаимодействуют преимущественно с GC-парами. При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК в связывание с поверхностью наночастицы наряду с карбонильными группами могут вовлекаться атомы азота гетероциклического кольца.

3. Формирование комплекса с наночастицами феррита кобальта приводит к ограничению доступности ДНК для взаимодействия с другими биомолекулами. Однако взаимодействие не приводит к деградации полинуклеотидной цепи и при десорбции ДНК с поверхности наночастицы ее функция может быть восстановлена.

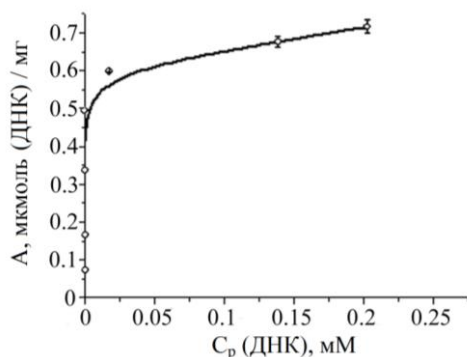
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Связывание фрагментов двухцепочечной природной ДНК и наночастиц феррита кобальта

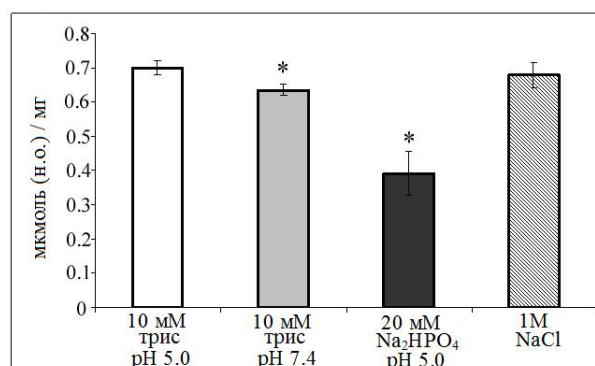
Для исследования взаимодействия наночастиц феррита кобальта с молекулами ДНК получали седиментационно-устойчивую суспензию наночастиц со средним гидродинамическим диаметром 20 нм в трис-буфере (рН 5,0). По данным спектрофотометрии 1 мг наночастиц феррита кобальта связывался с  $(0,7 \pm 0,02)$  мкмоль (в расчете на н.о.) фрагментов двухцепочечной ДНК, что приводило к формированию бионанокompозитного комплекса.

Согласно модели Штерна адсорбция групп биомолекул на поверхности частиц может происходить с формированием внешне- (с участием электростатических взаимодействий) или внутрисферных комплексов, за счет прямой координации с отдельными атомами металла. Характер экспериментально полученной изотермы адсорбции фрагментов двухцепочечной геномной ДНК на наночастицах феррита кобальта (рис. 1) свидетельствует об очень высоком сродстве ДНК к поверхности частиц, что характерно для образования внутрисферных комплексов.

С целью выяснения природы формирующихся связей между наночастицей и молекулой ДНК исследовали образование комплексов при варьировании параметров среды: ионной силы, рН, химического состава (рис. 2).

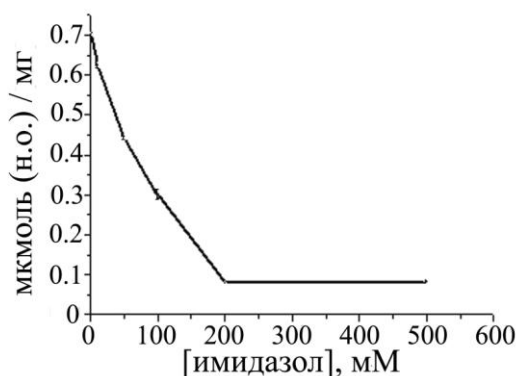


**Рис. 1** - Изотерма адсорбции фрагментов геномной ДНК на наночастицах феррита кобальта, 10 мМ трис-буфер (рН 5,0)



**Рис. 2** - Влияние химического состава среды на связывание фрагментов геномной ДНК и наночастиц феррита кобальта; \*-статистическая значимость отличия от связывания в 10 мМ трис-буфере (рН 5,0)

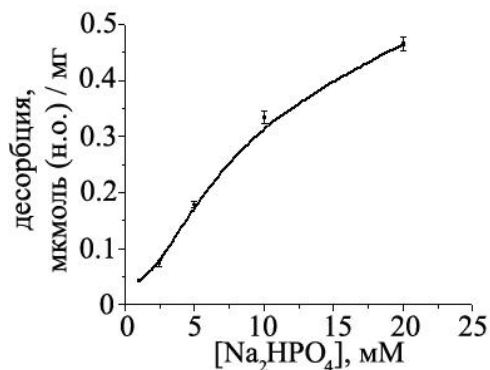
Повышение ионной силы раствора до 1 М не влияло на количество связываемой с наночастицами ДНК, что позволяет исключить ведущую роль электростатических взаимодействий в связывании. Снижение количества, связывающихся с наночастицами молекул при повышении рН среды до 7,4 на 9 %, указывает на определенную роль процессов протонирования фосфатных групп ДНК и/или поверхности наночастиц и, соответственно, водородных связей во взаимодействии. Значительное снижение (на 56 %) количества ДНК, связываемой с наночастицами, в присутствии фосфат-анионов свидетельствует о высоком сродстве фосфатных групп к поверхности наночастиц. Наблюдаемое концентрационно-зависимое снижение связывания ДНК с наночастицами в присутствии имидазола, блокирующего образование координационных связей, позволяет предполагать преимущественно координационное взаимодействие (рис. 3).



**Рис. 3** - Влияние имидазола на связывание фрагментов геномной ДНК с наночастицами феррита кобальта (рН 5,0)

Исследование стабильности полученного комплекса при варьировании параметров среды, а так же воздействию химических веществ, обладающих потенциальной активностью в направлении разрушения связей его компонентов, показало, что инкубация в растворе хлорида натрия с концентрацией от 0,1 до 1 М, трис-буфере со значением рН от 5,0 до 9,0 не приводила к разрушению связи ДНК-наночастица. Высокий уровень десорбции ДНК с поверхности наночастиц, наблюдаемый в натрий-фосфатном буфере (рис. 4), обусловлен конкуренцией фосфатных групп за центры связывания на поверхности наночастиц. Учитывая, что связывание с наночастицами может приводить к возникновению конформационного напряжения молекулы, анионы, образующиеся при диссоциации фосфата натрия, имеющие меньшие размеры и очень высокое сродство к поверхности, способны активно вытеснять функциональные группы ДНК.

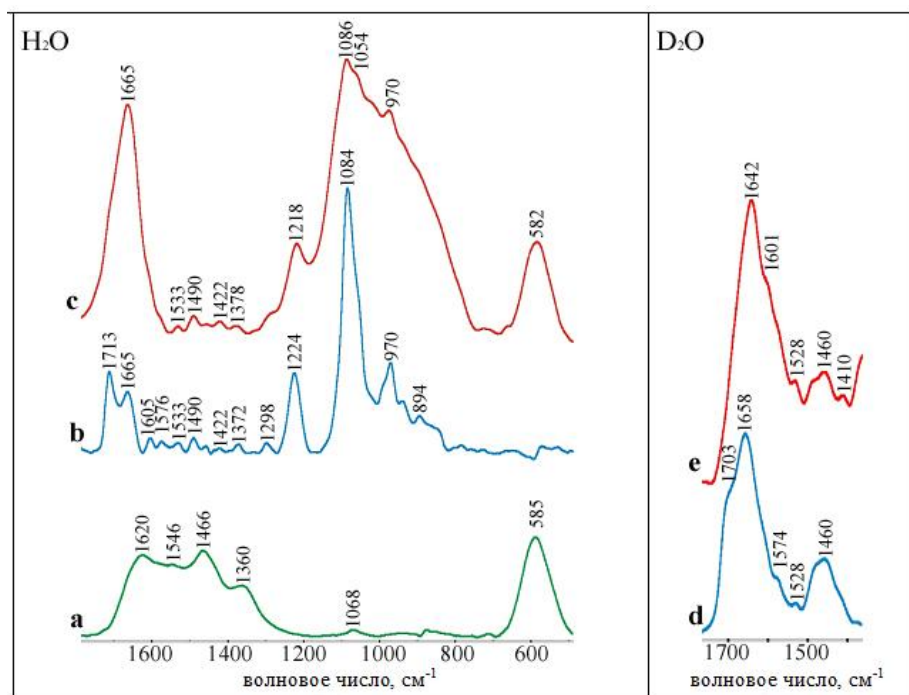




**Рис. 4** - Зависимость десорбции фрагментов геномной ДНК с поверхности наночастиц феррита кобальта от концентрации  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4)

Оценка методом гель-электрофореза показала, что при концентрации ЭДТА 50 мМ порядка 50 % ДНК десорбировалось с поверхности наночастиц. Эффективное разрушение связей компонентов бионанокompозита в результате инкубации в среде с ЭДТА, обладающего высокой склонностью к образованию хелатных комплексов с атомами переходных металлов, свидетельствует в пользу значительной роли координационных взаимодействий между группами ДНК и атомами металла на поверхности наночастиц в связывании.

Данные ИК-спектрометрического исследования комплекса (рис. 5) показали, что при связывании фосфатные группы ДНК координируются на поверхности наночастиц, на что указывает сближение п.п. симметричных и асимметричных колебаний фосфатной группы, относительно п.п. в спектре нативной ДНК (от 1224 к 1218  $\text{cm}^{-1}$  и от 1084 к 1086  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Рис. 5** - Фрагменты ИК-спектров наночастиц феррита кобальта (а), ДНК (b, d), бионанокompозитного комплекса ДНК-наночастицы феррита кобальта (c, e) в бидистиллированной ( $\text{H}_2\text{O}$ ) и дейтерированной ( $\text{D}_2\text{O}$ ) воде

Увеличение интенсивности колебаний при  $1665\text{ см}^{-1}$ , свидетельствует о вовлеченности атомов гетероциклических колец оснований во взаимодействие с наночастицами. Дательное исследование изменения положения п.п. колебаний групп оснований в области  $1800\text{-}1500\text{ см}^{-1}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  (рис. 5, **d**, **e**), показало, что во взаимодействии участвуют карбонильные группы гетероциклов, на что указывает изменение положения п.п. при  $1658$  (O2 цитозина) и  $1703\text{ см}^{-1}$  (O6 гуанина). Присутствие в спектре комплекса ДНК-наночастицы п.п. при  $1642\text{ см}^{-1}$ , свидетельствует о том, что разрыва АТ-пар не происходит, тогда как в связывание вовлекаются преимущественно GC-пары. Отсутствие изменения положения п.п. при  $1528$  и  $1486\text{ см}^{-1}$  позволяет исключить участие атомов азота гетероциклов в связывании.

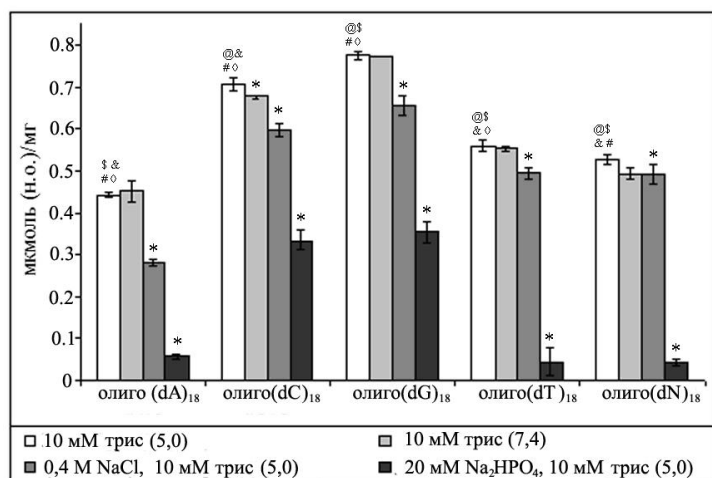
Формирование комплекса ДНК-наночастицы сопровождается исчезновением п.п. координированных на поверхности феррита кобальта карбонатных групп (в области  $1500\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ ), что является следствием их вытеснения группами молекулы ДНК.

Отметим, что ДНК, в комплексе с наночастицами, преимущественно сохраняет двуспиральное строение и относится к В-типу, на что указывает положение п.п. фосфата при  $1086\text{ см}^{-1}$  и  $1224\text{ см}^{-1}$ , а так же колебаний связей дезоксирибозы в  $\text{C}2'$ -эндо-анти-конформации (при  $1378$  и  $1422\text{ см}^{-1}$ ).

Наблюдаемые изменения ИК-спектра ДНК, входящей в состав бионаноконкомпозита, характерны для нуклеиновых кислот, вступающих в координационное взаимодействие с ионами переходных металлов. По данным литературы N7-атомы пуринов являются наиболее предпочтительными лигандами для связывания с переходными металлами. Преимущественное участие кислородных атомов в координационном взаимодействии с наночастицами может быть следствием дефектности решетки наночастиц феррита кобальта по кислороду, обусловленной спецификой их синтеза.

## 2. Связывание синтетических молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта

При исследовании взаимодействия наночастиц феррита кобальта с синтетическими олигонуклеотидами различного состава установлено, что эффективность адсорбции молекул на наночастицах, в том числе при изменении рН, ионной силы и химического состава среды, значительно варьирует в зависимости от нуклеотидного состава (рис. 6). Наиболее эффективно в трис-буфере с наночастицами феррита кобальта связывались олиго(dG)<sub>18</sub> и олиго(dC)<sub>18</sub> - (43,0±0,5) и (39,2±1) нмоль/мг соответственно, тогда как для олиго(dA)<sub>18</sub> наблюдали наиболее низкое связывание (24,3±0,4) нмоль/мг, для олиго(dT)<sub>18</sub> данный показатель составил 31,0±0,7 нмоль/мг, для гетероолигонуклеотида олиго(dA<sub>6</sub>dG<sub>6</sub>dC<sub>4</sub>dT<sub>2</sub>) - 28,5±0,6 нмоль/мг.

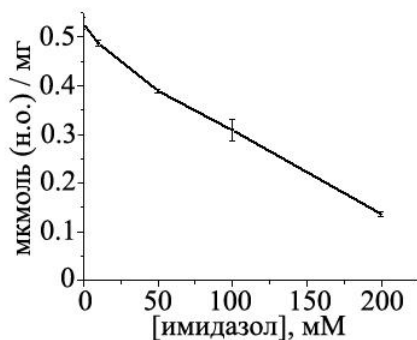


**Рис. 6** - Связывание наночастиц феррита кобальта с молекулами 18-мерных синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов при изменении химического состава среды; \* - статистическая значимость отличия от связывания олигонуклеотида в трис-буфере (рН 5,0), @ - статистическая значимость отличия от связывания олиго(dA)<sub>18</sub>, \$ - олиго(dC)<sub>18</sub>, & - олиго(dG)<sub>18</sub>, # - олиго(dT)<sub>18</sub>, ◇ - олиго(dA<sub>6</sub>dG<sub>6</sub>dC<sub>4</sub>dA<sub>2</sub>).

Отметим, что в отличие от фрагментов природной двухцепочечной ДНК повышение ионной силы приводило к снижению количества связываемых с наночастицами молекул для всех исследуемых групп одноцепочечных олигонуклеотидов на 6-36%. Повышение рН трис-буфера до 7,4 влияло только на количество связываемых молекул олиго(dC)<sub>18</sub>.

В присутствии фосфата натрия в инкубационной среде наблюдали значительное снижение количества связываемых с наночастицами молекул всех исследуемых групп одноцепочечных олигонуклеотидов: на 86-92 % для олиго(dA)<sub>18</sub>, олиго(dT)<sub>18</sub> и олиго(dA<sub>6</sub>dG<sub>6</sub>dC<sub>4</sub>dT<sub>2</sub>), в то время как для олиго(dG)<sub>18</sub> и олиго(dC)<sub>18</sub> эффективность связывания снижалась лишь на 51 и 54 %, соответственно.

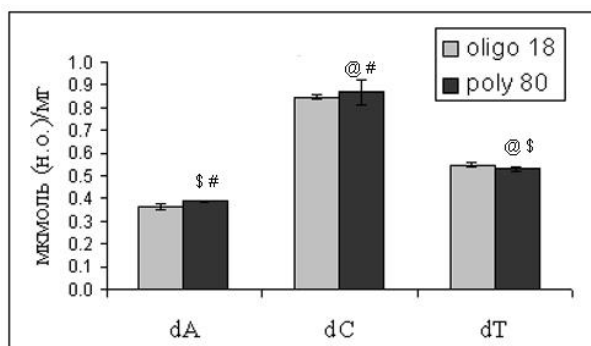
Повышение концентрации имидазола в среде концентрационно-зависимо снижало связывание олигонуклеотидов (рис. 7), как и в случае двухцепочечной ДНК, что свидетельствует о координационной природе формирующихся связей.



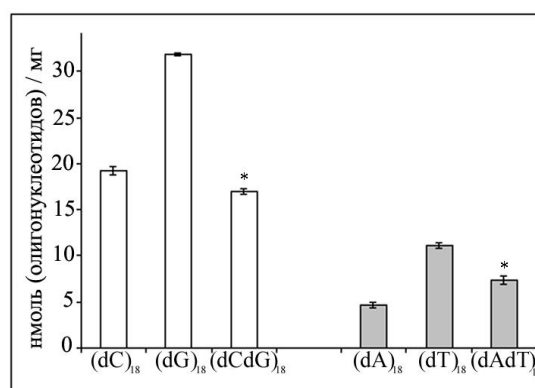
**Рис. 7** - Влияние имидазола на связывание олиго(dA<sub>7</sub>dG<sub>5</sub>dC<sub>4</sub>dT<sub>3</sub>) с наночастицами феррита кобальта (рН 5,0)

Результаты сравнения связывания 18ти и 80ти мерных одноцепочечных ДНК, показали, что длина молекулы не влияет на эффективность связывания ДНК с наночастицами (рис. 8).

При исследовании связывания ДНК-дуплексов, полученных в результате гибридизации гомоолигонуклеотидов, установлено, что в расчете на молекулу для олиго(dC)<sub>18</sub> и олиго(dG)<sub>18</sub> объединение в пару привело к снижению количества связываемых молекул, тогда как при формировании дуплекса олиго(dAdT)<sub>18</sub> количество связываемых молекул олиго(dA)<sub>18</sub> возросло, в то время как олиго(dT)<sub>18</sub> - снизилось (рис. 9). Наблюдаемый эффект свидетельствует о значительной роли структуры молекулы ДНК при взаимодействии с наночастицами.



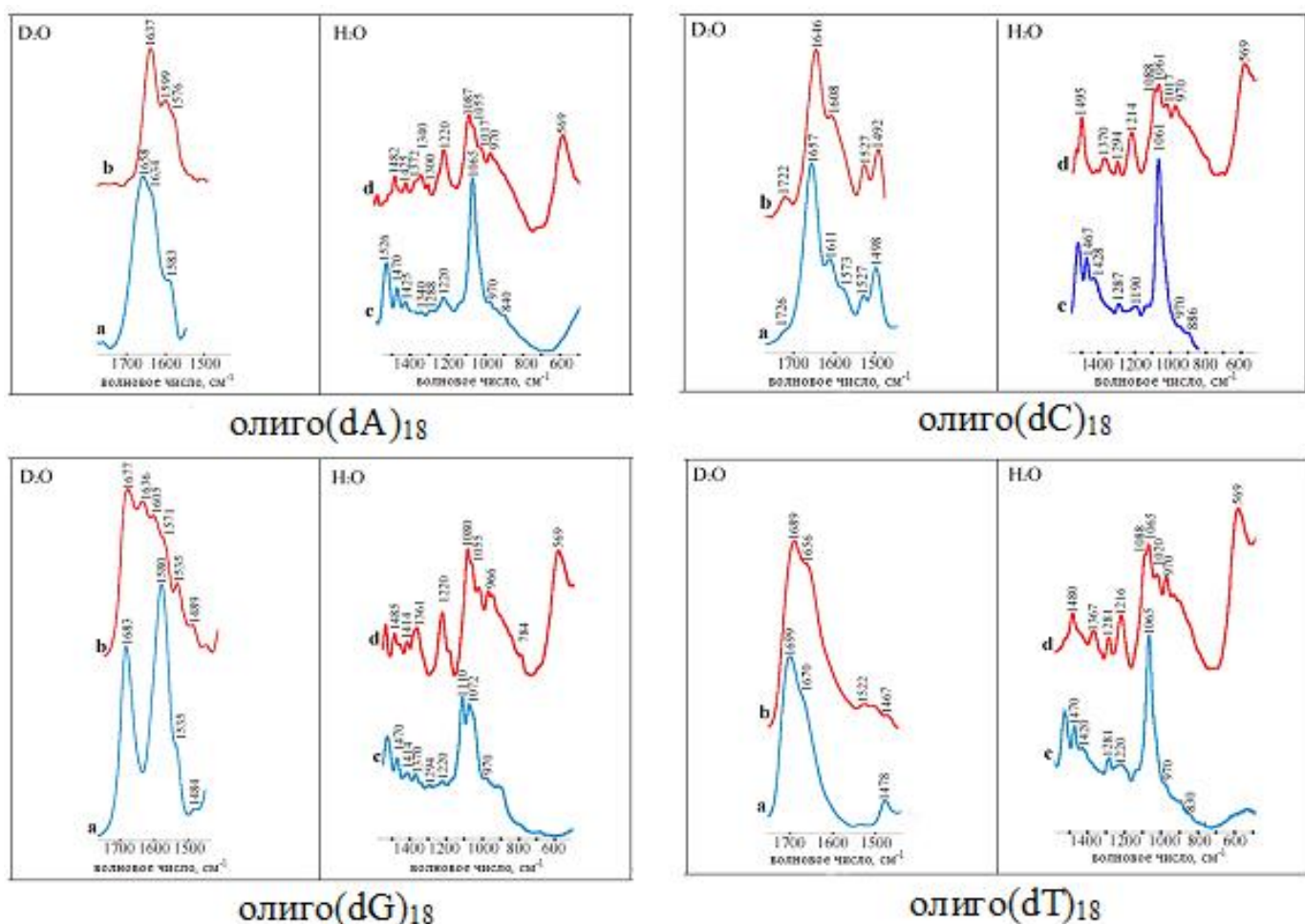
**Рис. 8** - Связывание наночастиц феррита кобальта с молекулами 18- и 80-мерных одноцепочечных ДНК, трис-буфер (рН 5,0); @ - статистическая значимость отличия от связывания поли(dA<sub>80</sub>), \$ - поли(dC<sub>80</sub>), # - поли(dT<sub>80</sub>)



**Рис. 9** - Связывание наночастиц феррита кобальта с молекулами одно- и двухцепочечных ДНК (8 мМ трис, 30 мМ NaCl, 1мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); \*- статистическая значимость отличия от связывания одноцепочечных олигонуклеотидов, входящих в дуплекс

Отметим, что GC-содержащая ДНК значительно эффективнее связывалась с наночастицами, чем AT-содержащая.

Анализ изменения ИК-спектров олигонуклеотидов при связывании с наночастицами подтверждает участие атомов оснований во взаимодействии с поверхностью наряду с атомами фосфатных групп (рис. 10). При взаимодействии олиго(dA)<sub>18</sub> в связывании участвует N7 атом (непрямое) и NH<sub>2</sub> группа основания, олиго(dC)<sub>18</sub> - O2 атом и NH<sub>2</sub> группа, олиго(dT)<sub>18</sub> - карбоксильные кислороды гетероцикла. При образовании комплекса наночастиц с олиго(dG)<sub>18</sub> во взаимодействие вовлекается O6 и N7 атомы (непрямое), при этом одновременное участие фосфатных групп и гетероциклического кольца нуклеотида в связывании приводит к изменению конформации дезоксирибозы с анти- на син (рис. 10).

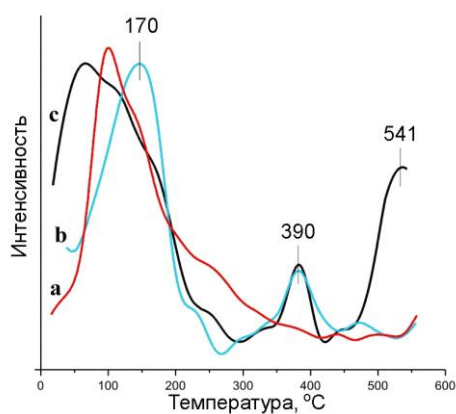


**Рис. 10** - Фрагменты ИК-спектров олигонуклеотидов (a, c) и их комплексов с наночастицами феррита кобальта (b, d) в бидистиллированной (H<sub>2</sub>O) и дейтерированной (D<sub>2</sub>O) воде

Наблюдаемая специфика взаимодействия олигонуклеотидов различного состава позволяет предположить, что присутствие C=O и NH<sub>2</sub> групп в гетероциклическом кольце цитозина и гуанина способствует формированию более выгодных связей с наночастицами. Однако анализ закономерностей взаимодействия гетероолигонуклеотида с наночастицами, как модели, например, олиго(dA)<sub>18</sub> последовательности с внесенными основаниями гуанина и цитозина, позволяет предполагать, что важную роль при взаимодействии играет вторичная структура молекулы и в формирование координационной сферы металла могут вовлекаться атомы соседних оснований олигонуклеотида. Так, расчет площади посадочной площадки ДНК-молекул показал, что площадь, занимаемая молекулами олиго(dG)<sub>18</sub> и олиго(dC)<sub>18</sub> на поверхности наночастицы на 22-28 %, а для поли(dC)<sub>80</sub> на 37% меньше площади линейной молекулы. Это можно рассматривать как свидетельство определенной «упаковки» молекулы на поверхности.

### 3. Исследование сорбционных свойств поверхности частиц нанопорошка феррита кобальта с использованием модельных молекул

Природа активных центров, присутствующих на поверхности наночастиц, будет определять группы молекулы ДНК, преимущественно вовлекаемые во взаимодействие. На рис. 11 представлены результаты сорбционных измерений на границе раздела газ - твердое тело методом термопрограммируемой хемосорбции. Наблюдаемая десорбция в области температур до 150 °С может быть отнесена к



**Рис. 11** - Десорбция с поверхности нанопорошка феррита кобальта молекул газов – NH<sub>3</sub> (a), CO (b) и CO<sub>2</sub> (c)

физически адсорбированным формам молекул NH<sub>3</sub> и CO<sub>2</sub>, в то время как более высокие температуры десорбции наблюдаемые для молекул CO и CO<sub>2</sub> свидетельствуют о хемосорбированном состоянии. Можно заключить, что молекулы аммиака слабо взаимодействуют с поверхностью феррита кобальта, в то время как оксиды углерода CO и CO<sub>2</sub> связываются более прочно.

При исследовании методом ИК-спектроскопии сорбции на наночастицах феррита кобальта молекул ДЭФ, наблюдали уменьшение разности между частотами валентных асимметричных и симметричных колебаний фосфатной группы ДЭФ, что позволяет сделать вывод о ее бидентантной координации на поверхности. Аналогичный сдвиг полос поглощения PO<sub>2</sub> группы проявляется в спектре ДНК, при связывании с наночастицами феррита кобальта (табл. 1).

Образец	$\nu_{as}PO_2, \text{ см}^{-1}$	$\nu_sPO_2, \text{ см}^{-1}$
ДЭФ (вода)	1198	1077
ДЭФ+CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1155	1089
ДНК (вода)	1224	1084
ДНК+CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1218	1086

**Табл. 1** – Смещение положения п.п. фосфатной группы молекул при взаимодействии с наночастицами феррита кобальта

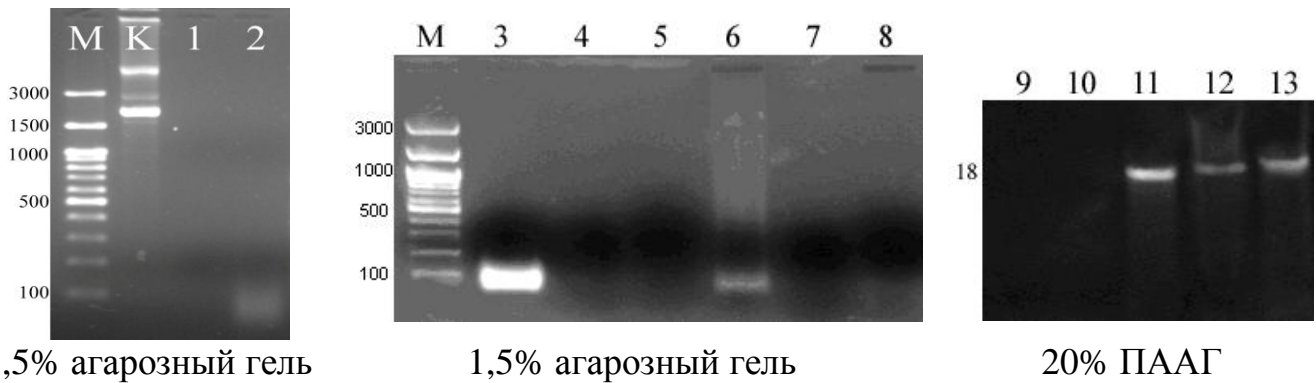
#### **4. Исследование доступности молекул ДНК, связанных с наночастицами, для ферментов (нуклеаз)**

Способность нуклеаз гидролизовать связи в молекуле ДНК определяется доступностью определенных групп атомов нуклеиновой кислоты для взаимодействия с молекулой белка. Связывание ДНК с наночастицами может препятствовать ферментативному расщеплению молекулы.

При электрофоретическом анализе продуктов ферментативной деградации наблюдали неполный гидролиз ДНК плазмиды pBLSK, связанной с наночастицами феррита кобальта, эндонуклеазой DNase I (рис. 12, дор. 2).

Сравнение эффективности гидролиза нуклеазами (DNase I и экзонуклеазой III) АТ- и GC-содержащих дуплексов, связанных с наночастицами, показало, что олиго(dAdT)<sub>80</sub> молекулы подвергались полному гидролизу (рис. 12, дор. 7, 8), тогда как олиго(dGdC)<sub>18</sub> практически не подвергались ферментативной деградации при тех же условиях (рис. 12, дор. 12, 13). В результате гидролиза плазмиды pBLSK рестриктазами: Msp I, Vsp I, Fau I установлено, что доступность GC- и АТ-сайтов молекулы ДНК, связанной с наночастицами, различалась. При ферментативном гидролизе плазмиды, связанной с наночастицами, ферментом Vsp I, имеющим сайт узнавания 5'-АТ^ТААТ-3', на электрофореграмме выявляли фрагменты, соответствующие нативной и рестриктированной плазмидной ДНК (рис. 13, дор. 3).



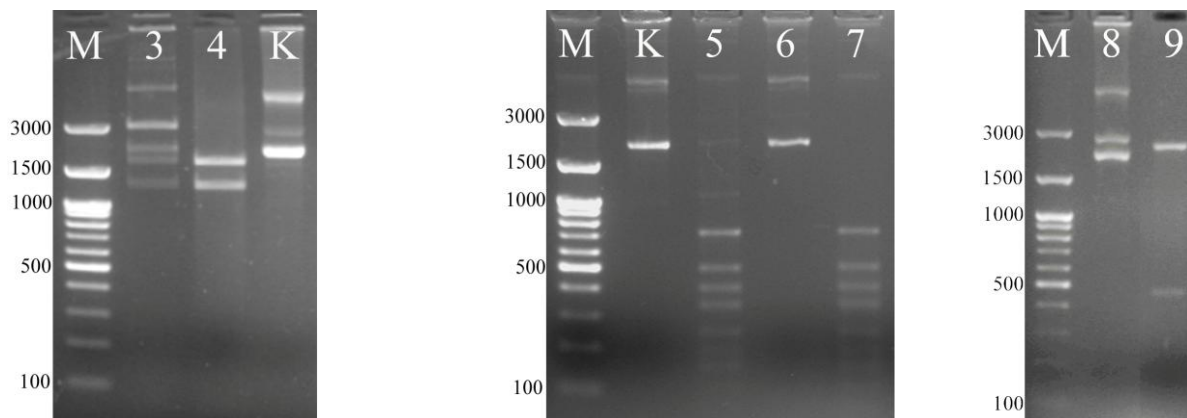


**Рис. 12** - Электрофореграммы продуктов гидролиза свободных и связанных с наночастицами феррита кобальта молекул ДНК нуклеазами; М – маркер молекулярного веса, К – pBLSK; 1 – pBLSK + DNase I; 2 – pBLSK-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 3 – олиго(dAdT)<sub>80</sub>; 4 - поли(dAdT)<sub>80</sub>, гидролизованная DNase I; 5 - поли(dAdT)<sub>80</sub>, гидролизованная экзонуклеазой III; 6 - поли(dAdT)<sub>80</sub>, отделенная от частиц (50 мМ ЭДТА); 7 - поли(dAdT)<sub>80</sub>-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 8 - поли(dAdT)<sub>80</sub>-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + экзонуклеаза III (элюция 50 мМ ЭДТА); 9 – олиго(dGdC)<sub>18</sub> + DNase I; 10 - олиго(dGdC)<sub>18</sub> + экзонуклеаза III; 11 - олиго(dGdC)<sub>18</sub>, отделенная от частиц (50 мМ ЭДТА); 12 - олиго(dGdC)<sub>18</sub>-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 13 - олиго(dGdC)<sub>18</sub>-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + экзонуклеаза III (элюция 50 мМ ЭДТА).

Тогда как рестриктазы, имеющие GC-сайт узнавания: Msp I (5'-C<sup>^</sup>CGG-3') и Fau I (5'-CCCGC(N)<sub>4</sub><sup>^</sup>-3'/-3'-GGGCG(N)<sub>6</sub><sup>^</sup>-5') – ДНК, в комплексе с наночастицами, не гидролизовали (рис. 13 дор. 6 и 8). Для проверки возможного ингибирования наночастицами феррита кобальта ферментативной активности Msp I и Fau I, рестрикцию соответствующими ферментами проводили в реакционной смеси содержащей избыток плазмидной ДНК (200 нг) и наночастицы феррита кобальта (240 нг) или комплекс плаزمиды-наночастицы. Во всех экспериментах плазмидная ДНК успешно гидролизовалась в данных условиях.

Важно отметить, что в результате обработки плазмиды, высвобожденной из комплекса с наночастицами PBS-буфером, ферментом Msp I наблюдали исчерпывающий гидролиз молекулы ДНК с образованием набора фрагментов ожидаемой длины (рис. 13 дор. 7). Следовательно, связывание с наночастицами не приводит к необратимым изменениям субстратных, в первую очередь структурных, свойств молекулы плазмиды и не вызывает деградации молекулы ДНК.





**Рис. 13** - Электрофореграммы свободной и связанной с наночастицами ДНК плазмиды pBLSK и продуктов ее гидролиза (1,5 % агарозный гель); М – маркер молекулярного веса, К – pBLSK; 3 – pBLSK-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + Vsp I (элюция 50 мМ ЭДТА); 4 – pBLSK + Vsp I; 5 - pBLSK + Msp I; 6– pBLSK-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + Msp I (элюция 50 мМ ЭДТА); 7 – pBLSK, отделенная от частиц PBS-буфером + Msp I; 8 - pBLSK-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + Fau I (элюция 50 мМ ЭДТА); 9 - pBLSK + Fau I

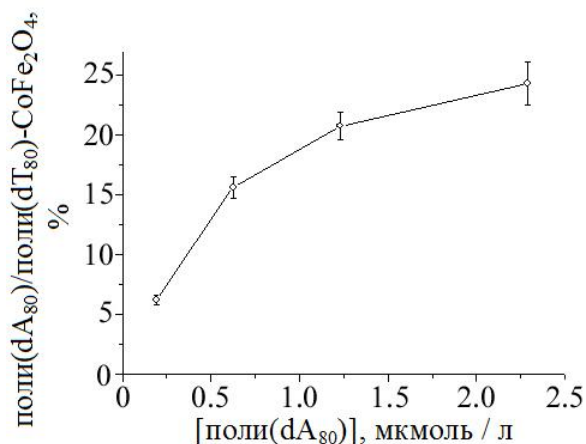
Наблюдаемое различие в эффективности гидролиза по АТ- и GC-сайтам указывает на преимущественное связывание наночастиц с GC-парами молекулы ДНК, что приводит к стерическим затруднениям для работы фермента, тогда как АТ-пары ДНК практически не вовлекаются во взаимодействие с наночастицами. Это хорошо согласуется с данными ИК-спектрометрических исследований комплекса молекул ДНК и наночастиц. Наблюдаемое замедление гидролиза плазмиды, входящей в комплекс с наночастицами, ферментом Vsp I по АТ-содержащим сайтам обусловлено, вероятно, зависимостью скорости работы фермента от правильности структуры нуклеотидных пар прилегающих к сайту узнавания.

## 5. Влияние взаимодействия с наночастицами на целостность и функциональные свойства ДНК

Интегральной характеристикой позволяющей оценить эффекты, оказываемые наночастицами на молекулу ДНК в результате их взаимодействия, может служить проверка функциональных свойств ДНК.

При исследовании способности оцДНК, закрепленных на поверхности наночастиц к гибридизации с комплементарной ДНК в растворе установлено, что только комплексы содержащие поли(dT)<sub>80</sub>, эффективно связывали и удерживали

поли(dA)<sub>80</sub>, в то время как поли(dC)<sub>80</sub> и олиго(dG)<sub>18</sub>, закрепленные на наночастицах, не удерживали данные молекулы (рис. 14). Отметим, что полученное соотношение поли(dT)<sub>80</sub> - CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> : поли(dA)<sub>80</sub> в пересчете на молекулу полинуклеотида равное 1:4 указывает, что более 75 % оснований «недоступно». Это может быть обусловлено либо их вовлечением во взаимодействие с поверхностью и/или стерическими ограничениями.



**Рис. 14** - Эффективность связывания поли(dA)<sub>80</sub> из раствора с поли(dT)<sub>80</sub>, закрепленном на наночастице феррита кобальта

В следующей серии экспериментов влияние связывания с наночастицами на функцию ДНК оценивали по способности плазмиды pBLSK трансформировать прокариотические клетки. Установлено, что ДНК в комплексе с наночастицами не трансформировала клетки *E. coli*. Для исключения возможности повреждающих эффектов на молекулу ДНК, таких как разрывы и деградация, в результате взаимодействия с наночастицами, были проведены эксперименты, в которых в качестве вектора трансформации использовали плазмиду, отделенную от наночастиц PBS-буфером после связывания. Отделенная от наночастиц плаزمида успешно трансформировала клетки *E. coli*. Более того, такой же уровень трансформации достигался при использовании в качестве вектора плазмиды, высвобожденной после обработки комплекса рестриктазой Msp I (табл. 2).

**Табл. 2** - Эффективность трансформации клеток *E. coli* XL1-blue свободной и связанной с наночастицами феррита кобальта плазмидой pBLSK

ДНК-вектор	Количество колоний
pBLSK (контроль)	10 <sup>3</sup>
pBLSK, связанная с наночастицами	0
pBLSK, отделенная от наночастиц PBS-буфером	10 <sup>2</sup>
pBLSK, отделенная от наночастиц PBS-буфером, после инкубации с MspI	10 <sup>2</sup>

Снижение количества трансформантов, по сравнению с контролем, связано с тем, что при выдерживании в элюирующем буфере десорбируется не вся ДНК от наночастиц (по данным спектрофотометрических исследований - 58 %).

Неспособность плазмиды связанной с наночастицами трансформировать клетки *E. coli* может быть обусловлена следующими альтернативными причинами: либо комплекс не проникал в клетки, либо генетическая информация (устойчивость к антибиотику) не реализовывалась, вследствие недоступности молекулы ДНК для ферментов репликации и транскрипции. Второе предположение хорошо согласуется с данными о значительном снижении доступности ДНК, связанной с наночастицами, для эндонуклеаз. Таким образом, при отделении молекулы ДНК от наночастиц ее функция может быть восстановлена, связывание с наночастицами обратимо и не вызывает деградации молекулы.

## **6. Модель комплексов ДНК- $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ и схема диагностической конструкции**

На основании совокупности полученных данных нами предложена модель комплекса, формирующегося в результате взаимодействия наночастиц феррита кобальта, полученных методом механохимического синтеза, и молекул синтетических и природных ДНК. При взаимодействии атомы переходных металлов, присутствующие на поверхности наночастиц, координируют атомы фосфатных групп и карбонильные кислороды гетероциклических оснований молекулы ДНК с образованием внутрисферных комплексов. Связывание стабилизируется взаимодействиями N-H ( $\text{NH}_2$ ) и P-OH групп с поверхностью наночастицы. При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК в связывание могут вовлекаться так же атомы азота пуринового кольца. Эффективное связывание с поверхностью наночастицы реализуется в области GC-трактов двухцепочечных молекул при одновременном участии атомов оснований и фосфатных групп ДНК во взаимодействии; при связывании с одноцепочечными молекулами в формирование координационной сферы вовлекаются атомы соседних оснований, что обуславливает значительную роль вторичной структуры молекулы.



двухцепочечных природных молекулах ДНК наночастицы взаимодействуют преимущественно с основаниями GC-пар.

3. На поверхности наночастиц феррита кобальта присутствуют хемосорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции выше 150 °С, для молекул кислотной природы и только физадсорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции ниже 150 °С, для молекул основной природы.

4. Связывание с наночастицами феррита кобальта препятствует взаимодействию рестриктаз с GC-сайтами ДНК, тогда как AT-сайты могут быть гидролизованы.

5. Молекула ДНК при взаимодействии с наночастицами феррита кобальта сохраняет свою целостность. ДНК плазмиды в комплексе с наночастицами не способна трансформировать клетки прокариот, однако высвобождение из комплекса приводит к восстановлению данной функции.

6. Согласно предложенной модели нанобиокомпозитного комплекса прочное связывание с наночастицей феррита кобальта реализуется в результате одновременного формирования связей типа:  $X=O \cdots Me$  и  $Y-H \cdots O-Me$  (где  $X = C, P$ ;  $Y = O, N$ ;  $Me = Co, Fe$ ) и достигается в области GC-трактов двухцепочечных молекул при одновременном участии атомов оснований и фосфатных групп ДНК во взаимодействии.

Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н., зам.зав. ЦНИЛ СибГМУ Сазонову А.Э., сотрудникам ОСМ ТНЦ СО РАН: к.ф.-м.н., в.н.с. Итину В.И., к.т.н., ученому секретарю Тереховой О.Г., к.х.н., с.н.с. Магаевой А.А., сотрудникам ХФ ТГУ: к.х.н., доценту Изаак Т.И., к.х.н., зав. лаб. каталитических исследований Князеву А.С., м.н.с. Зарубиной О.Н., студенту Новикову Д.В., а так же м.н.с. ИТ НОЦ ТГУ Полюшко В.А., м.н.с. ТМЦ КП ТГУ Новикову В.А., к.х.н., сотруднику НАЦ ТПУ Федотовой М.П., к.ф.-м.н., сотруднику НПО «Вирион» Миллеру А.А.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Першина А. Г., Сазонов А. Э., Мильто И. В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // Бюлл. сиб. мед. –2008. –№ 2. –С. 70-78.
2. Першина А. Г., Сазонов А. Э., Огородова Л. М. Исследование механизмов взаимодействия ДНК и наночастиц феррита кобальта методом ИК-Фурье-спектromетрии // Биоорган. хим. –2009. –Т. 35. –С. 674-680.
3. Магаева А. А., Терехова О. Г., Итин В. И., Радишевская Н. И., Найден Е. П., Егорова Л. А., Иванчук И. И., Першина А. Г. Механохимический синтез наноразмерных порошков на основе диоксида олова // Ж. приклад. хим. –2009. –Т. 82. –С. 220-223.
4. Першина А. Г., Сазонов А. Э., Огородова Л. М. Исследование устойчивости ДНК, связанной с ферромагнитными частицами нанопорошка феррита кобальта, к нуклеазному расщеплению // Бюлл. эксп. биол. мед. –2010. –Т. 148. –С. 74-77.
5. Першина А. Г., Ефимова Л. В., Итин В. И., Терехова О. Г., Магаева А. А., Серебров В. Ю., Сазонов А. Э. Наноразмерный стабилизатор ферментов на основе частиц феррита кобальта // Нанотехника. –2010. –Т. 2. –С. 81-87.
6. Pershina A. G., Serebrov V. Yu., Sazonov A. E. Investigation of Interaction between Oligonucleotides and Cobalt Ferrite Nanoparticles // eCells & Materials. –2010. –V. 20. –P. 201.
7. Pershina A. G., Sazonov A. E., Novikov D. V., Knyazev A. S., Izaak T. I., Itin V. I., Naiden E. P., Magaeva A. A., Terechova O. G. Study of DNA Interaction with Cobalt Ferrite Nanoparticles // J. Nanosci. Nanotech. –2011. –V. 11. –P. 2673-2677.
8. Патент РФ № 2319153 Композиционный наноразмерный материал для адсорбции и десорбции ДНК/РНК / Итин В. И., Иванчук И. И., Терехова О. Г., Магаева А. А., Першина А. Г., Найден Е. П., Максимов Ю. М. Оpubл. 10.03.2008 г.