

УДК 537.622.3:577.323.23

МАГНИТНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК КРОВИ

© 2020 г. А. В. Комина^{1,2,*}, Р. Н. Ярославцев^{1,3}, Ю. В. Герасимова³,
С. В. Столяр^{1,3}, И. А. Ольховский^{1,2}, М. Ш. Баирмани^{4,5}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

²Красноярский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения “Гематологический научный центр” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

³Институт физики имени Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Астраханский государственный университет”, Астрахань, Россия

⁵Зеленый университет Аль-Касым, Биотехнологический колледж, Аль-Касым, Ирак
*E-mail: komivlann@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Метод выделения ДНК из клеток крови, использующий магнитные частицы, обладает преимуществом экономии времени и перспективой автоматизации процесса выделения. Разработан метод получения магнитных наночастиц железа для выделения ДНК из клеток крови. Получены и исследованы магнитные наночастицы, обладающие характеристиками, достаточными для выделения геномной ДНК из лейкоцитов.

DOI: 10.31857/S0367676520110162

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярно-генетические исследования клеток крови играют очень важную роль с современной медициной, и в частности, гематологией. Выявление генетических нарушений или изменений в реализации генетической информации является важным диагностическим и прогностическим фактором при лечении заболеваний крови. Так, хронический миелолейкоз в 95% случаев диагностируется по присутствию в опухолевых клетках особой химерной молекулы РНК BCR-ABL1, количество которых позволяет судить о степени прогрессии заболевания и выраженности ответа на лечение [1]. Большое количество различных генетических модификаций являются определяющими при исследованиях острых лейкозов, миелопролиферативных заболеваний и др. [2]. Кроме того, выявление мутаций в ДНК злокачественных клеток крови позволяет подобрать индивидуальную схему лечения для каждого случая заболевания [3, 4].

Выделение нуклеиновых кислот – ДНК или РНК – первый и очень важный этап большинства молекулярно-генетических исследований. От количества и качества очищенной молекулы зависит валидность результата исследования и пра-

вильность сделанных выводов. На сегодняшний день, описано несколько способов выделения нуклеиновых кислот из крови, как внутриклеточных молекул, так и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих вне клеток [5]. Они учитывают особенности материала, но каждый имеет свои достоинства и недостатки [6]. Одним из перспективных среди них является использование магнитных частиц с особыми покрытиями, позволяющими захватывать молекулы нуклеиновых кислот. Этот метод обладает преимуществами меньших затрат времени (в сравнении с осаждением), меньшей токсичностью реагентов (в сравнении с фенол-хлороформной экстракцией), меньшими требованиями к лабораторному оборудованию (отсутствии необходимости центрифугирования). При этом использование магнитных частиц позволяет добиваться получения нуклеиновых кислот высокой чистоты для исследований высокопроизводительными и требовательными методами (микрочипирование, секвенирование нового поколения). Наконец, использование магнитов открывает возможности для автоматизации процессов выделения нуклеиновых кислот. Однако, несмотря на преимущества и активные исследования [7], на сегодняшний день в России реагенты для

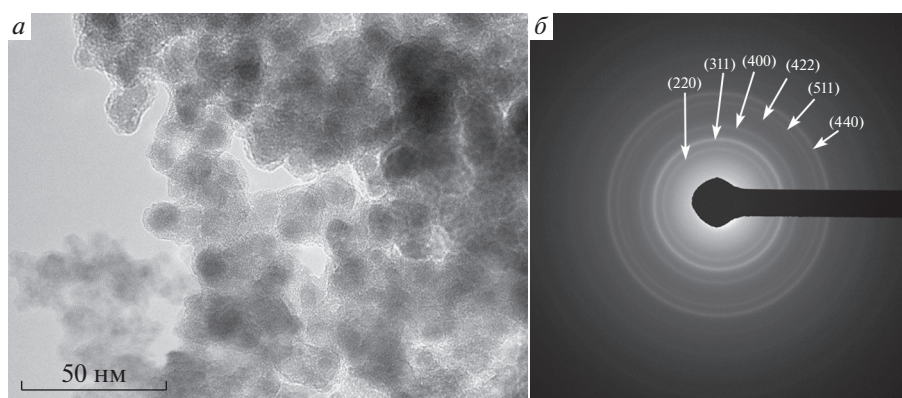


Рис. 1. Изображения, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ синтезированных при механическом перемешивании: (а) внешний вид частиц; (б) картина микродифракции.

выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах разрабатываются недостаточно, оставаясь недооцененными, подобно методу безлинзовой микроскопии крови [8], и многие наборы приобретаются из зарубежных стран, что повышает их стоимость. Основными трудностями, которые необходимо преодолевать при использовании данного метода, являются способность магнитных наночастиц к агломерации [9], что снижает их функционально активную площадь для захвата молекул нуклеиновых кислот, а также способность соединений железа влиять на протекание последующих реакций с очищенной молекулой.

Целью настоящей работы являлась разработка доступной технологии синтеза магнитных наночастиц железа для выделения ДНК из клеток крови для проведения молекулярно-генетических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения частиц магнетита были использованы хлориды железа FeCl_3 и $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в молярном соотношении 2 : 1, в соответствии с методикой, описанной Портаковой А.В. с коллегами [10]. Осаждение частиц магнетита происходило при защелачивании раствора аммиачной водой (25%) до pH 10 при помощи быстрого введения щелочи тонкой струей через иглу шприца. После внесения аммиачной воды емкость с реакционной смесью герметично закрывали и инкубировали при непрерывном перемешивании 30 мин.

Для сепарации полученного осадка использовали неодимовый магнит. Частицы стабилизировали 5 мМ цитратом натрия (pH 6–7) и отмывали деионизованной водой до получения чистой промывной жидкости.

В качестве доступного покрытия для магнитных наночастиц был выбран оксид кремния в

виде тетраэтоксисилана (ТЭОС, TEOS). Для покрытия частицы магнетита суспендировали в смеси этанол : вода (9 : 1) в концентрации 20, 10 мг/мл и перемешивали в течение 10 мин. Затем вносили TEOS из расчета 70 мкл на 200 мг наночастиц.

При нанесении покрытия использовалось два режима обработки: разбиение ультразвуком в режиме кавитации (в течение 1 ч) и механическое перемешивание. Все варианты магнитных наночастиц с покрытием оксидом кремния отмывали дистиллированной водой с сепарацией на неодимовом магните и хранили в ультрачистой воде (18 мОм/см^3) в концентрации 400 мг/мл.

Полученные образцы исследовались с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 и вакуумного Фурье-спектрометра VERTEX 80V (BRUKER) в средней ИК области $380\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ центра коллективного пользования Красноярского научного центра СО РАН.

Для выделения ДНК при помощи разработанных магнитных наночастиц использовали набор реагентов “ДНК-собр-В” (AmpliSens, Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя, но используя магнитные наночастицы вместо поставляемого в наборе силикатного сорбента. Выделение ДНК производили из лейкоцитов, полученных из 130 мкл крови человека. Количество и качество геномной ДНК оценивали при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ полученных при механическом перемешивании представлены на рис. 1. В процессе покрытия оксидом кремния при механическом перемешивании произошло образование конгломератов наночастиц железа с

общей силикатной оболочкой. Средний размер частиц при использовании механического перемешивания составляет ~ 10 нм, однако, за счет агрегации, общий размер частицы с покрытием увеличился до сотен нм. Согласно дифракционному изображению наночастицы представляют собой магнетит со структурой шпинели.

На рис. 2 представлен ИК-Фурье спектр наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$, полученных при механическом перемешивании, в сравнении со спектром Fe_3O_4 . В спектре образцов наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ мы наблюдаем появление очень сильного колебания с максимумом 1091 см^{-1} , которое относится к валентным ассиметричным колебаниям силексановых групп ($\nu_{\text{as}} \text{Si-O-Si}$) [11]. В спектрах, исследуемых образцов валентное колебание $\nu\text{-OH}$ образует интенсивную полосу в области $3200\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$. Положение и характер этой полосы зависит от участия гидроксильной группы в водородной связи, в нашем случае широкая и слабоструктурированная полоса свидетельствует о большом разнообразии состояний молекул воды в образцах. Полоса деформационных колебаний воды $\delta\text{-OH}$ расположена в области $1600\text{--}1650 \text{ см}^{-1}$. Слабые колебания 950 и 800 см^{-1} в спектре наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ относятся к деформационным и валентным колебаниям силанольных групп Si-OH соответственно рис. 2а. Для полос с частотами менее 600 см^{-1} довольно трудно провести соотнесение с конкретными колебаниями, но они так или иначе связаны с колебаниями связей Fe-O . Также известно, что колебания связей Fe-O и Si-O в их оксидных соединениях различаются незначительно. Отсутствие полосы поглощения $\sim 3700 \text{ см}^{-1}$ свидетельствует об успешном модифицировании по свободным силанольным группам. Анализ инфракрасных спектров, позволяет утверждать, что силексановые группы принимают участие в процессах связи между магнитными частицами Fe_3O_4 и слоем кремнезема, а силанольные группы наиболее активны на поверхности и являются химически активными для образования ковалентной связи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выделении ДНК частицами для изготовления покрытия которых использовалось механическое перемешивание было получено количество ДНК, сравнимое таковым при использовании коммерческого набора с силикатным сорбентом (рис. 3а). Однако на начальных этапах апробации при оценке качества полученной ДНК на электрофорезе отмечалось изменение свойств очищенной молекулы, отражаемое в виде неполного вхождения ДНК в агарозный гель (рис. 3). Это может быть связано с дозозависимым влиянием магнитных наночастиц железа на молекулы

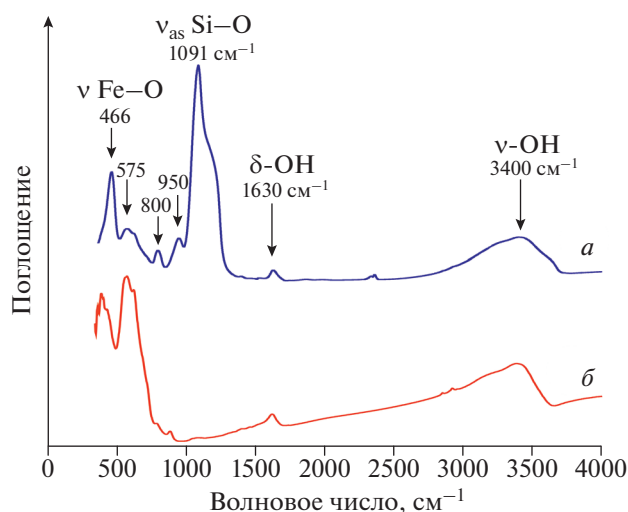


Рис. 2. ИК-Фурье спектры при комнатной температуре наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ (а) и Fe_3O_4 (б).

ДНК, способными взаимодействовать с основаниями молекулы и вызывать изменения ее структуры [12], либо с наличием посторонних примесей в растворе. Преодоление повреждающего действия магнетита на молекулы живого организма описано в литературе, и для его преодоления предлагаются химические модификации наночастиц при синтезе [13, 14], однако в настоящей работе при работе с отдельными молекулами была предпринята попытка избегания дополнительных компонентов. И уже при уменьшении количества вносимых при выделении магнитных частиц с 18 до 15 мг в образец эффект влияния магнитных частиц был заметно снижен: на электрофорезе отмечалось равномерное вхождение очищенной ДНК в агарозный гель (рис. 3). Количество ДНК, выделенной наночастицами, при изготовлении покрытия которых, использовался ультразвук, было значительно меньше (рис. 3) и в отдельных экспериментах приравнивалось к следовому, несмотря на ожидаемое уменьшение агрегации и увеличение отношения площади поверхности силикатного покрытия к объему частиц. Причины такого эффекта требуют более тщательного изучения, однако, в силу отсутствия желаемого результата при выделении ДНК, в настоящей работе более подробное исследование этих частиц не производилось. Однако описанное ранее влияние акустической кавитации на структуру частиц ферригидрита позволяет предполагать подобные процессы и в данном случае [15].

Таким образом, получение магнитных наночастиц оксида железа для эффективного выделения ДНК в лабораторных условиях возможно без использования ультразвуковой дезагрегации частиц, при помощи простого механического перемешивания.

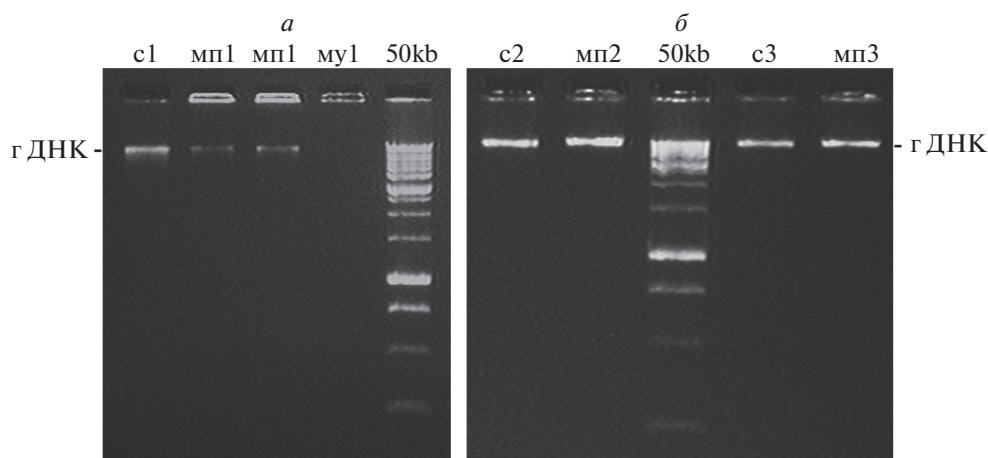


Рис. 3. Электрофорез в агарозном геле очищенной геномной ДНК, выделенной при помощи набора реагентов ДНК-сорб В с использованием различных сорбентов: коммерческий силикатный сорбент (с1-3), магнитные наночастицы, покрытые оксидом кремния при механическом перемешивании при внесении в пробу 18 мг (мп1) и 15 мг (мп2, мп3) наночастиц; магнитные наночастицы, покрытые оксидом кремния при участии ультразвука (му1). гДНК – геномная ДНК. 50kb – ДНК маркер.

вания. При этом, снижение влияния наночастиц железа на ДНК возможно контролировать при помощи изменения количества частиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chauhan R., Sazawal S., Pati H.P. // *Ind. J. Hematol. Blood Transfus.* 2018. V. 34. № 2. P. 197.
2. Kang Z.J., Liu Y.F., Xu L.Z. et al. // *Chin. J. Cancer.* 2016. V. 35. P. 48.
3. Alikian M., Gerrard G., Subramanian P.G. et al. // *Am. J. Hematol.* 2012. V. 87. № 3. P. 298.
4. Чельшева Е.Ю., Шухов О.А., Лазарева О.В. и др. // *Клин. онкогем.* 2012. Т. 5. № 1. С. 13; Chelysheva E.Y., Shukhov O.A., Lazareva O.V. et al. // *Clin. Oncohematol.* 2012. V. 5. № 1. P. 13.
5. Тамкович С.Н., Челобанов Б.П., Дужак Т.Г. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2015. Т. 64. № 6. С. 1458; Tamkovich S.N., Chelobanov B.P., Duzhак T.G. // *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* 2015. V. 64. № 6. P. 1458.
6. Ali N., Rampazzo R.C.P., Costa A.D.T. et al. // *Biomed. Res. Int.* 2017. V. 2017. Art. № 9306564.
7. Berensmeier S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. № 3. P. 495.
8. Градов О.В., Насиров Ф.А., Яблоков А.Г. // *Фотоника.* 2018. Т. 12. № 7(75). С. 716.
9. Sharma G., Kodali V., Gaffrey M. et al. // *Nanotoxicology.* 2014. V. 8. № 6. P. 663.
10. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10559>.
11. Sobhani S., Pakdin-Parizia Z. // *RSC Adv.* 2014. V. 4. № 25. P. 13071.
12. Ansari M.O., Parveen N., Ahmad M.F. et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. № 6912.
13. Неуен Т.Л., Низамов Т.Р., Абакумов М.А. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2018. Т. 82. № 9. С. 1335; Nguyen T.L., Nizatov T.R., Abakumov M.A. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2018. V. 82. № 9. P. 1214.
14. Демин А.М., Хонина Т.Г., Шадрина Е.В. и др. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2019. № 6. С. 1178; Demin A.M., Khonina T.G., Shadrina E.V. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. № 6. P. 1178.
15. Столяр С.В., Байуков О.А., Ладыгина В.П. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2017. Т. 81. № 5. С. 660; Stolyar S.V., Bayukov O.A., Ladygina V.P. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2017. V. 81. № 5. P. 608.