

УДК 537.622.3:577.323.23

НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК КРОВИ

© 2021 г. А. В. Тюменцева^{1,2,*}, А. С. Горбенко^{1,2}, Р. Н. Ярославцев^{1,3}, С. В. Столяр^{1,3,4},
Ю. В. Герасимова^{3,4}, С. В. Комогорцев³, О. А. Баюков³, Ю. В. Князев³,
М. Н. Волочаев³, И. А. Ольховский^{1,2}, Р. С. Исхаков³

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 и социального развития
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 автономное образовательное учреждение высшего образования
“Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

*E-mail: komivlann@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.04.2021 г.

После доработки 12.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Получены магнитные наночастицы с силикатным покрытием, изучены их физико-химические свойства. Экспериментально подтверждена возможность использования полученных наноконструкций для выделения ДНК из лейкоцитов для генетических исследований.

DOI: 10.31857/S0367676521090180

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные наночастицы представляют большой интерес для биологии и медицины, как для фундаментальных исследований, так и для применения в различных областях [1–6]. Использование магнитных наночастиц для сепарации биологических молекул получило большое распространение благодаря простоте применения, относительной безопасности в сочетании с возможностью получить чистый продукт, возможности автоматизации процесса. Однако, несмотря на преимущества, данная технология создает ряд трудностей, среди которых высокая реакционная способность оксидов металлов, их воздействие на молекулы нуклеиновых кислот с возможным повреждением последних [7]. По этой причине биосовместимость магнитной наноконструкции является очень важной характеристикой, обуславливающей применимость разработанных частиц в биомедицине [8]. Степень воздействия частиц на мишеневую молекулу может зависеть от их химического состава, размера, концентрации и других показателей [9].

Наночастицы оксидов железа являются одними из наименее агрессивных соединений для биологических объектов [10]. Наиболее часто используемыми формами оксида железа в биомедицине являются магнетит (Fe_3O_4) и маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Согласно результатам работы [11] частицы со средним размером более 60 нм демонстрируют физические свойства и кристаллическую структуру массивного магнетита с параметром решетки $a = 0.8383$ нм. Наночастицы оксида железа достаточного малых размеров являются нестехиометрическим соединением магнетит-маггемитового ряда. Такое соединение может быть описано кристаллохимической формулой $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}_{1-3n}^{2+}\text{Fe}_{1+2n}^{3+}\phi_n]\text{O}_4$, где ϕ – обозначение вакансий, n – их формульный коэффициент [11]. При размерах менее 10 нм частицы по составу и структуре близки к маггемиту.

Модификация поверхности таких частиц веществами, обладающими более высокой сорбционной емкостью и химической стойкостью, позволяет получить конструкции с высокой функциональ-

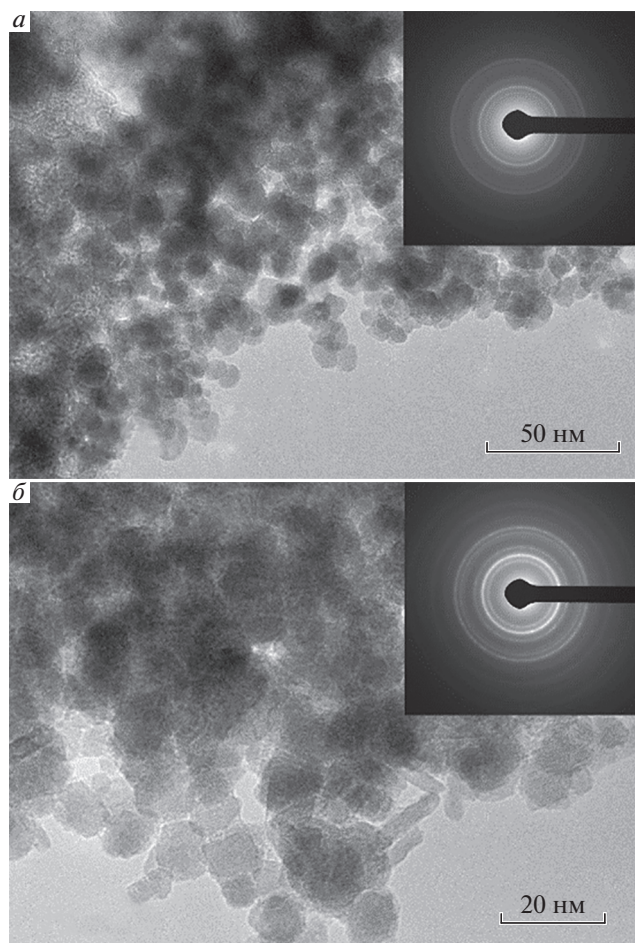


Рис. 1. Изображения наночастиц, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения, и дифракционные картины. Частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1 (а); частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1 (б).

ной активностью и минимальным побочным действием на целевые молекулы [12]. При этом наиболее простое покрытие для выделения нуклеиновых кислот – силикатное (SiO_2). Выделение ДНК является одним из первых и очень важным этапом клинической лабораторной диагностики при молекулярно-генетических исследованиях и ряде тестов на наличие инфекционных заболеваний. Наиболее часто используемым материалом при этом является кровь. Поэтому разработка и оптимизация методов выделения ДНК из клеток крови не теряет актуальности.

Целью работы была разработка наномангнитных конструкций на основе наночастиц оксидов железа для сепарации молекул ДНК из клеток крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Магнитные частицы были получены методом соосаждения из раствора солей FeCl_3 и FeCl_2 в молярном соотношении 2.7 : 1 и 2 : 1 при комнатной температуре. Навески растворяли в дистиллированной воде и при перемешивании вводили в раствор NH_4OH (25%) до достижения pH 10. Продолжали перемешивание в течение 4 ч (для 2.7 : 1) и 30 мин (для 2 : 1). По окончании реакции магнитные наночастицы в обоих случаях собирали при помощи магнита и отмывали несколько раз в дистиллированной воде до установления pH 7.0. Поверхность частиц модифицировали оксидом кремния с использованием тетраэтоксисилана (TEOS) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES). Полученные наночастицы были исследованы методами электронной просвечивающей микроскопии, ИК-спектроскопии, мессбауэровской спектроскопии, магнитометрии. Исследования выполнялись на оборудовании Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопические изображения (рис. 1) показывают, что наночастицы, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1, имеют сферическую форму ($d \sim 10$ нм), а частицы, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1, имеют форму пластин со средним размером 11 нм и толщиной 2.5 нм. На вставках к рис. 1 приведены дифракционные картины, на которых регистрируются все характерные для наночастиц магнетит-маггемитового ряда отражения.

На рис. 2б приведен спектр мессбауэровской спектроскопии наночастиц, синтезированных из раствора с отношением солей 2.7 : 1. Компоненты спектров представлены цветными линиями. Состояния атомов в суперпарамагнитном состоянии характеризуются в данном спектре синглетом. Состояния атомов в заблокированном состоянии характеризуются секстетам. В табл. 1 приведены параметры обнаруженных неэквивалентных позиций катионов Fe^{3+} и их принадлежности. Используя заселенности позиций и соотношение $(A_5 + A_4 + A_3) = V_s/V$, где V – общий объем наночастицы, V_s – объем ее поверхностной области, A_3 , A_4 и A_5 – заселенность поверхностных и приповерхностных позиций согласно табл. 1, оценили толщину поверхностного слоя, которая составила 5.6 \AA [13].

Модельный спектр наночастиц, синтезированных из раствора с отношением солей 2 : 1 (спектр а) аппроксимирован суммой одного сек-

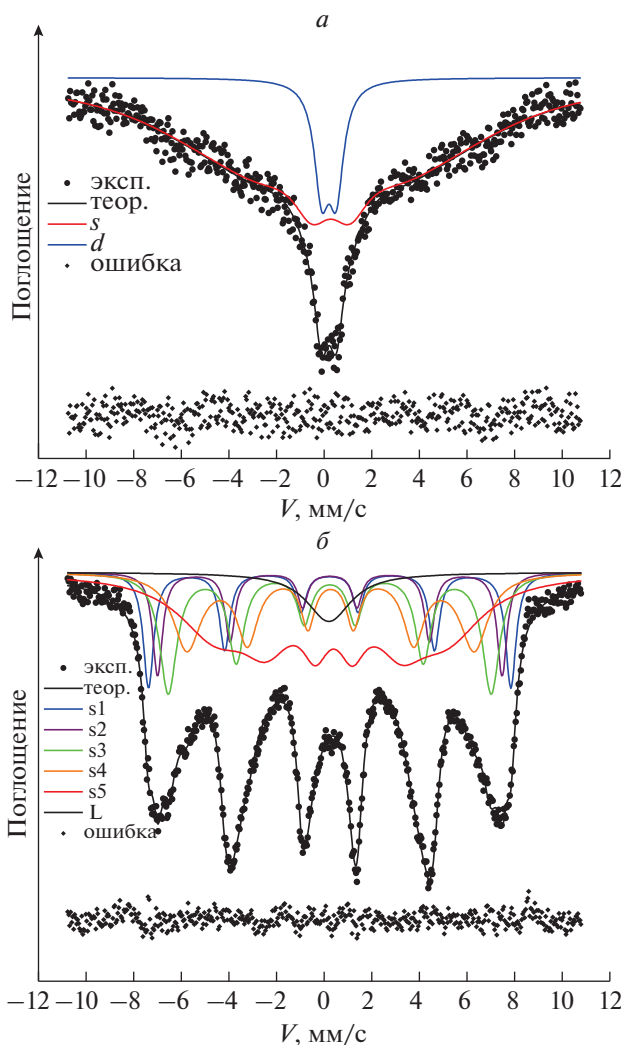


Рис. 2. Мессбауэровские спектры. Частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1 (а); частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1 (б).

стета и одного дублета. Результат подгонки сведен в табл. 1. Судя по величинам химических сдвигов, все железо в образцах находится в трехвалентном высокоспиновом состоянии. По сравнению с образцом (б) секстеты показывают очень широкие линии поглощения со значительным уширением внешних линий. Флуктуации сверхтонких полей по позициям образца могут составлять от 180 до 440 кЭ.

Основная часть железа (~90%), находится в магнитоупорядоченном состоянии при комнатной температуре (секстет). Парамагнитный дублет составляет ~10% от общей площади спектра. Уменьшение сверхтонкого поля на атомах железа магнитной фазы относительно образца (б) может означать уменьшение эффективности или числа межатомных взаимодействий (разупорядочение решетки) или же уменьшение размеров нанокристаллитов. Уширение резонансных линий, а так-

же величины сверхтонкого поля в данном образце обусловлено релаксационными эффектами, т.е. данные частицы при комнатной температуре находятся вблизи перехода от суперпарамагнитного к ферромагнитному порядку. Температура перехода в суперпарамагнитное состояние (температура блокировки $T_B \sim KV/k_B$, где k_B – константа Больцмана) определяется объемом частицы V и магнитной анизотропией K . Линейные размеры двух видов обсуждаемых частиц близки (см. рис. 1), однако за счет того, что частицы (б) имеют форму пластин, добавляется вклад анизотропии формы и температура блокировки увеличивается. Заблокированные частицы, вследствие диполь-дипольного взаимодействия, склонны к образованию агломератов, вследствие чего уменьшается удельная площадь поверхности. Суперпарамагнитные частицы сложнее собирать с помощью магнитного поля. Таким образом, для маг-

Таблица 1. Мессбауэровские параметры

	IS	H	QS	W_{34-16}	A	Позиция
(a)	0.34	472	0.01	0.53–0.53	0.11	Fe^{3+} – тетраэдрическое окружение
	0.35	449	0	0.50–0.50	0.09	Fe^{3+} – октаэдрическое окружение
	0.34	421	0	0.71–0.87	0.19	Fe^{3+} – тетраэдрические приповерхностные
	0.38	374	0	0.70–1.40	0.19	Fe^{3+} – октаэдрические приповерхностные
	0.45	303	–0.23	1.40–3.74	0.37	Fe^{3+} – поверхность
	0.31	–	–	2.26	0.05	Fe^{3+} – суперпарамагнитные частицы
(б)	0.39	311	0	2.0–8.3	0.90	Fe^{3+} – ферромагнитные частицы
	0.31	–	0.61	0.75	0.10	Fe^{3+} – суперпарамагнитные частицы

IS – изомерный химический сдвиг. QS – квадрупольное расщепление, ± 0.02 мм/с. W – ширина линии поглощения на полувысоте, ± 0.02 мм/с. A – долевая заселенность позиции, ± 0.03 . H – сверхтонкое поле, кЭ.

нитной сепарации, по-видимому, наиболее пригодными являются частицы, находящиеся в ферромагнитном состоянии с T_B вблизи комнатной.

На рис. 3 представлены ИК–Фурье спектры магнитных наночастиц (a – частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1; б – частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1).

Анализ ИК-спектров показал наличие связей Fe–O (a – 580, б – 590 cm^{-1}) у всех образцов. В спектрах наночастиц пики сильных валентных колебаний силоксановых групп Si–O (a – 1091 и б – 1087 cm^{-1}) и силанольных групп Si–OH (~800 и ~960 cm^{-1}) доказывают образование оболочки оксида кремния на поверхности наночастицы. Валентное колебание ν -OH образует интенсивную полосу в области 3200–3600 cm^{-1} в исследуемых образцах.

В полученных спектрах происходит смещение пика Si–O от 1091 до 1087 cm^{-1} и уменьшение его интенсивности. Изменения происходят и с деформационными колебаниями (~463 cm^{-1}) связи Si–O, наиболее интенсивными они являются в спектре (a) (см. рис. 3). Такие отличия спектра (a) со спектром (б), могут быть связаны с тем, что в образце (б) содержится высокая концентрация OH-групп. Установлено, что силоксановые группы принимают участие в процессах связи между магнитными частицами и слоем кремнезема, а силанольные группы наиболее активны на поверхности и являются химически активными для образования ковалентной связи. Наличие OH-групп на поверхности частиц кремнезема может тормозить процессы гибридизации молекул ДНК.

Произведено выделение ДНК из клеток крови при помощи разработанных магнитных частиц с использованием растворов коммерческого набо-

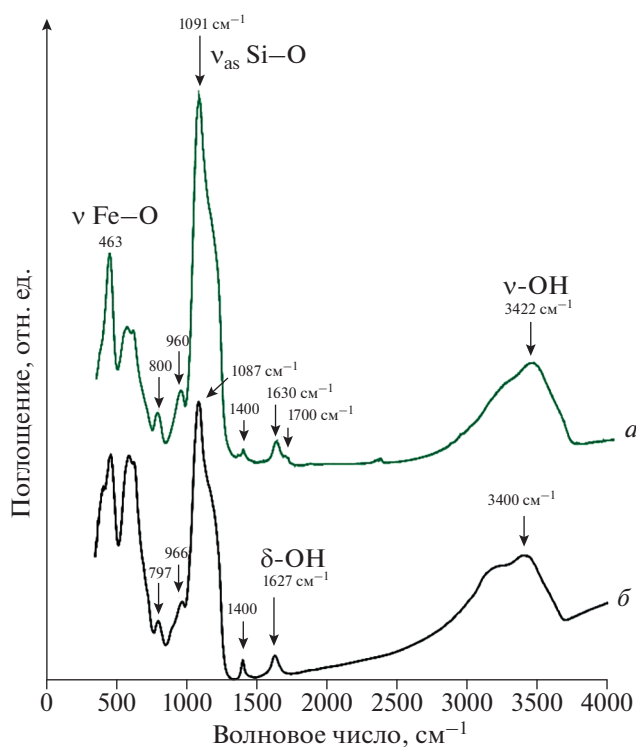


Рис. 3. ИК-Фурье спектры. Частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1 (a); частицы оксида железа, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1 (б).

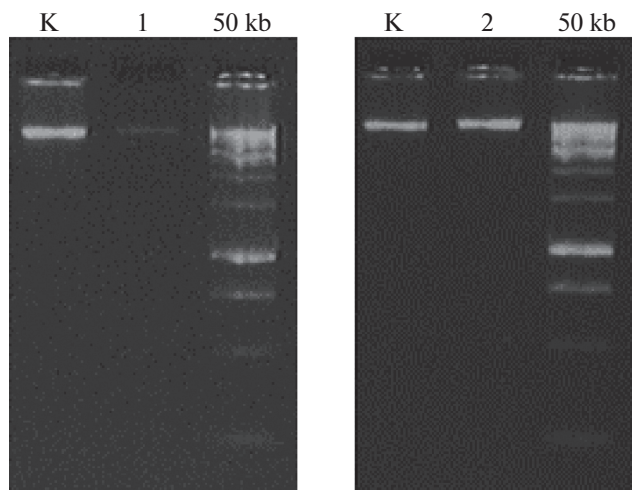


Рис. 4. Результат анализа ДНК, выделенной при помощи МНЧ: электрофорез ДНК в 1% агарозном геле. К – контроль выделения (силикатный сорбент), 1 – частицы, синтезированные из раствора с отношением солей 2.7 : 1; 2 – частицы, синтезированные из раствора с отношением солей 2 : 1; 50 kb – маркер молекулярного веса ДНК 50 kb.

ра реагентов ДНК-сорб-В (AmpliSens, Москва, Россия). В качестве контроля выделения был использован полный набор ДНК-сорб-В, включающий силикатный сорбент для ДНК. Количество и качество ДНК, полученное в результате использования магнитных наночастиц, синтезированных из раствора солей железа в соотношении 2 : 1, было сопоставимо с количеством, выделенным при помощи силикатного сорбента. Электрофорез полученной ДНК в агарозном геле (рис. 4) продемонстрировал единую четкую полосу очищенных молекул, что указывает на их целостность, отсутствие фрагментации. Это делает пробы применимыми для последующих генетических исследований. Интенсивность свечения полос ДНК пропорциональна ее количеству и позволяет утверждать, что магнитные наночастицы способны выделять из смеси молекулы нуклеиновых кислот в количестве, сопоставимом с использованием стандартного силикатного сорбента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы наночастицы оксида железа покрытые силикатной оболочкой при различных условиях получения. Изучение ИК-спектров показало, что наночастицы полученные из раствора солей железа в соотношении 2.7 : 1 имеют на своей поверхности повышенную концентрацию ОН-групп. Данные образцы также имеют высокую температуру блокировки относительно образца, полученного из раствора солей железа в соотношении 2 : 1.

Выделение ДНК из клеток крови показало, что образец “2 : 1” по количеству и качеству выделенного ДНК не уступает силикатному сорбенту. В то время как образец “2.7 : 1” оказался недостаточно эффективен для выделения.

Таким образом, для магнитной сепарации ДНК более пригодными оказались частицы, синтезированные из раствора солей железа в соотношении 2 : 1. Это обусловлено тем, что данные частицы находятся в ферромагнитном состоянии с T_B вблизи комнатной, а на поверхности отсутствуют ОН-группы, ингибирующие связывание молекул ДНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 20-42-242902). Работа поддержана Советом по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект № МК-1263.2020.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mornet S., Vasseur S., Grasset F. et al. // Progr. Sol. St. Chem. 2006. V. 34. Nos. 2–4. P. 237.
2. Neuberger T., Schöpfa B., Hofmann H. et al. // J. Magn. Magn. Mater. 2005. V. 293. No. 1. P. 483.
3. Stolyar S. V., Balaev D. A., Ladygina V. P. et al. // J. Supercond. Nov. Magn. 2018. V. 31. No. 8. P. 2297.
4. Berry C.C., Curtis A.S.G. // J. Phys. D. 2003. V. 36. No. 13. Art. No. R198.
5. Chilom C.G., Sandua N., Bălăşoiu M. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 164. P. 3559.
6. Chilom C.G., Zorilăb B., Bacalum M. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2020. V. 226. Art. No. 104851.
7. Gaharwar U.S., Meena R., Rajamani P. // J. Appl. Toxicol. 2017. V. 37. No. 10. P. 1232.
8. Никифоров В.Н. // Наука. Технол. Пром. 2011. № 1. С. 90.
9. Комина А.В., Ярославцев П.Н., Герасимова Ю.В. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2020. Т. 84. № 11. С. 1597; Комина А.В., Ярославцев Р.Н., Герасимова Ю.В. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2020. V. 84. No. 11. P. 1362.
10. Dadfar S.M., Roemhildab K., Drude N.I. et al. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2019. V. 138. P. 302.
11. Салихов С.В., Савченко А.Г., Гребенников И.С., Юртов Е.В. // Изв. РАН. Сер. физ. 2015. Т. 79. № 9. С. 1251; Salikhov S.V., Savchenko A.G., Grebennikov I.S., Yurtov E.V. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2015. V. 79. No. 9. P. 1106.
12. Tolmacheva V.V., Apyari V.V., Kochuk E.V. et al. // J. Analyt. Chem. 2016. V. 71. No. 4. P. 321.
13. Zakharova I.N., Shipilin M.A., Alekseev V.P. et al. // Tech. Phys. Lett. 2012. V. 38. No. 1. P. 55.

Iron oxide nanoparticles for DNA isolation from blood cells

**A. V. Tyumentseva^{a, b, *}, A. S. Gorbenko^{a, b}, R. N. Yaroslavtsev^{a, c}, S. V. Stolyar^{a, c, d}, Yu. V. Gerasimova^{c, d},
S. V. Komogortsev^c, O. A. Bayukov^c, Yu. V. Knyazev^c, M. N. Volochaev^c,
I. A. Olkhovskiy^{a, b}, R. S. Iskhakov^c**

^a*Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences",
Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^b*Krasnoyarsk Branch of the Hematological Scientific Center of the Ministry of Health and Social Development
of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^c*Kirensky Institute of Physics, Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^d*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

**e-mail: komivlann@yandex.ru*

We developed a technology of iron oxide magnetic nanoparticles synthesis for DNA separation from blood cells. As a result, magnetic nanoparticles with a silicate coating have been obtained, and their physical and chemical properties studied. The possibility of using the obtained nanocomposites for the DNA isolation from leukocytes for hematological studies has been experimentally confirmed.