

## НАНОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

в.к. ПЛОТНИКОВ\*

**Нанобиотехнология — это быстро прогрессирующая область научных и технологических возможностей создания новых методов познания биосистем на основе конструирования специфических структур в нанометровом диапазоне. Достижения нанобиотехнологии особенно важны для разработки новых методов биодиагностики, основанной на применении наночастиц для специфической детекции в биоаналитических и клинических направлениях. Дан краткий обзор работ авторов и литературных данных по синтезу, оптическим свойствам, функциолизации и применениям плазмонно-резонансных наночастиц.**

*Ключевые слова:* нанобиотехнология, наночастицы, биодиагностика, биосистемы.

### **Революционное развитие методов в молекулярной биологии**

В 2008 г. исполнилось 55 лет науке, которая называется молекулярная биология и которая составляет основу практически всей современной биологии. Как известно, 1953 г. считается годом рождения молекулярной биологии когда в журнале «Nature» вышла статья Джеймса Уотсона и Френсиса Крика, объясняющая строение ДНК как вещества наследственности (двойная спираль) [1]. С тех пор исследованию нуклеиновых кислот как ДНК, так и РНК придаётся особое значение. Положение «самой главной молекулы» от ДНК в настоящее время переходит к РНК как центральному звену живой материи, обладающему и свойствами матрицы, подобно ДНК, и ферментативными свойствами, подобно белкам [2].

Молекулярная биология непрерывно заимствует методы физики и химии. Последние три десятилетия

ознаменованы новыми технологиями и методами, которые определили не только прогресс прошедших десятилетий, но и ближайшего десятилетия. Наиболее поразительными методическими достижениями ближайших десятилетий была разработка методов геной инженерии в 70-е годы, достигших массового распространения в 80-е годы, виртуозного совершенства и практически безграничного применения в 90-е годы XX века. 1970-е годы стали эпохой ещё одной методической революции — были созданы два метода секвенирования ДНК (метод Максама-Гилберта и метод Сэнгера), что превратило ДНК и РНК из объекта биологического в объекты, имеющие точную химическую структуру — нуклеотидную последовательность. Важнейшей вехой методической революции в молекулярной биологии было создание метода размножения ДНК в пробирке с помощью цепной полимеразной реакции (ПЦР).

\* Государственное научное учреждение Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени П.П. Лукьяненко.

Сейчас очевидно, что перестало быть проблемой установление первичной структуры гена, но всё ещё остаётся проблема, как узнать его функцию и как ею управлять. Первое десятилетие XXI века ознаменовано стремительным прорывом в важнейшую биологическую проблему — регуляцию экспрессии генов с помощью явления РНК-интерференции и основанных на этом явлении методов «нокаутов» — техники, позволяющей выводить из строя заранее выбранный ген, а затем смотреть, как это скажется на организме. Суть явления, механизм которого пока изучен очень слабо, состоит в том, что двуспиральные РНК определённой структуры вызывают распад мРНК мишени — гена, экспрессию которого необходимо подавить. Это широко распространённое в природе явление (повидимому, от бактерий до млекопитающих) может эффективно использоваться для идентификации новых генов, выяснения их функциональной роли и управления их экспрессией *in vitro* и *in vivo*. Необходимо подчеркнуть, что это чисто биологический метод [3, 4, 5].

Кроме того, интегрализм биологии XXI века означает, что ответ на нерешённые в прошлом проблемы будут искать не путём изолированного изучения отдельных генов или генных продуктов, а через анализ интегральных ответов клетки на то или иное воздействие или состояние. Ясно, что ответ клетки на сигнал (например, воздействие биорегулятора на рецептор, появление низкомолекулярного биорегулятора в окружающей клетку среде и т.д.) носит всегда многозвенный характер: отвечает не один ген, а множество, подчас самых неожиданных и внешне не связанных с исходным воздействием.

То обстоятельство, что успехи современной молекулярной биологии не столь решительно сказались в таких областях, как, например, биология

развития, во многом связано именно с тем, что только интегральный подход — анализ тысяч генов, а не единиц действительно ведёт к пониманию закономерностей эмбриогенеза, дифференцировки и других составляющих биологии развития. В развитии интегрализма, идущему на смену редукционизму, огромную роль призвана играть новая технология — биологические микрочипы, — позволяющая на ничтожном пространстве в несколько квадратных сантиметров анализировать тысячи молекул, например, функционирование тысяч генов [6, 7, 8].

Принципиально новые перспективы в исследовании ДНК и РНК и в их практическом использовании появляются в последние 15 лет в связи с развитием методов нанобиотехнологий.

#### Что такое нанобиотехнология?

Термин «нанотехнология» впервые был использован японским учёным Н. Танигучи в 1974 г. на конференции Японского общества точного машиностроения. Автор хотел обратить внимание специалистов на грядущий переход к обработке материалов с ультравысокой точностью, прогнозируя, что к 2000 г. эта точность достигнет нанометрового интервала, что потребует применения как новых технологических приёмов, так и соответствующего метрологического обеспечения [9, 10].

Однако, принципиальное значение малоразмерных объектов было отмечено значительно раньше — в 1959 г. лауреатом Нобелевской премии физиком-теоретиком Ричардом Фейнманом. При обсуждении проблем миниатюризации в лекции «Внизу полностью места: приглашение в новый мир» подчёркивалась актуальность работ в области сжатия информации, создания миниатюрных компьютеров, овладение молекулярной архитектурой. Фейнман затрагивал также проблемы смазки в малых узлах тре-

ния, обращал внимание на необходимость учёта квантовых эффектов в небольших квантовых ансамблях, указывал на важность понимания молекулярно-биологических явлений. Большие надежды Фейнман возлагал на химический синтез, отмечая при этом, что законы физики не запрещают конструирование на атомно-молекулярном уровне [10].

В настоящее время под нанотехнологиями подразумевается конструирование молекул или частиц размером от  $10^{-9}$  до  $10^{-6}$  м. Таковы размеры белков, ДНК и РНК, антител, вирусов. Бактерии и клетки человека (зона  $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  м) не относятся к наночастицам. Это микромир. Нанобиотехнологии предполагают конструирование, а не банальное применение перечисленных молекул и частиц [10—12].

Нанобиотехнология, как её определяет Совет РАН по нанотехнологиям, — это конструирование новых материалов и устройств на основе естественных или синтетических макромолекул, конструирование новых биологических структур на основе синтетических биополимеров. Молекулярные биологи имеют дело с объектами порядка нескольких нанометров: все вирусы, белки, рибосомы, молекулы ДНК и РНК попадают в этот размер. Академик В.В. Власов отметил, что «работая с нуклеиновыми кислотами и белками, мы всегда, по сути, занимались нанобиотехнологией, только не использовали этот недавно появившийся термин. Наверное, правильно будет сказать, что пока мы на данных объектах занимаемся фундаментальными исследованиями (это называется молекулярной биологией), но если исследования ориентированы на получение конкретного результата, на создание технологии, то это нанотехнология» [14].

Молекулярно-биологические объекты обладают рядом замечательных свойств. Во-первых, они способны избирательно взаимодействовать друг

с другом; например, белки обладают способностью связываться с другими определёнными белками и органическими молекулами. Всем известно, что две цепочки ДНК образуют двуспиральную структуру. Механизм избирательного взаимодействия биомолекул расшифрован, молекулы эти можно получать в больших количествах биотехнологическими методами и на их основе создавать новые материалы. В структуре этих материалов могут быть вмонтированы с высокой степенью упорядоченности любые вещества и нанообъекты, например, металлические наночастицы.

Нанобиотехнологии можно применять не только для создания новых материалов. На основе биомолекул возможно создание «биомашин», различных устройств и сенсоров. В области разработки молекулярных машин активно ведутся исследовательские работы. Доказано, что можно сделать движущиеся наноструктуры, «шагающие роботы», выполненные из молекул ДНК. Они способны двигаться в определённом направлении по молекуле ДНК при подведении к ним энергии. Что касается наносенсоров (НК-зависимых переключателей, молекулярных сенсоров, сенсоров на основе гибридных конструкций, которые состоят из нуклеиновых кислот и белка), они уже находят широкое применение в молекулярной диагностике. Создано множество диагностических систем для медицины, основанных на олигонуклеотидах, самособирающихся в комплекс на анализируемой ДНК, получены патенты на такие системы и ДНК-чипы. Разработаны наноразмерные неорганические структуры — «квантовые капли», которые за счёт квантовых эффектов окрашены в различный цвет и используются как спектральные метки для диагностических систем.

Разработаны оригинальные биосенсоры для визуализации определённых вирусных РНК. Преимущест-

вами новых нанобиосенсоров являются: селективность по отношению к РНК; высокая чувствительность; стабильность биосенсоров *in vitro* и *in vivo*. Крайне важными направлениями является создание из ДНК новых материалов, различных двумерных и трёхмерных структур. На их основе могут быть получены совершенно новые материалы для электроники. Ведутся работы по получению химически модифицированных нуклеиновых кислот, которые необходимы для получения таких материалов.

Важнейшей задачей нанобиотехнологии является создание средств доставки терапевтических препаратов в определённые виды клеток. В частности, необходимо создание методов введения в клетки ДНК и РНК для развития генотерапии. В этом отношении разработаны новые подходы к доставке РНК и ДНК, основанные на биотехнологических подходах. Для стимуляции связывания нуклеиновых кислот с клетками предложено формировать из них комплексы, представляющие собой наноразмерные частицы. Такие частицы формируются за счёт нековалентных взаимодействий нуклеиновых кислот между собой и катионными полимерами. Частицы эффективно связываются с клеточной поверхностью, что способствует их успешному поглощению клеткой. Эти исследования открывают возможность создания действенных методов генотерапии.

Одним из развитых направлений нанотехнологий являются биочиповые технологии, без которых современная биология и медицина уже не могут существовать. Биочиповая технология — современная нанотехнология анализа генетического материала, позволяющая проводить скрининг сложных смесей нуклеиновых кислот. Это индустрия высоких технологий, базирующаяся на современных достижениях химии, биологии, физики, микроэлектроники, информатики и

других отраслей знаний. Биочип представляет собой пластинку, несущую на своей поверхности множество различных зондов — фрагментов нуклеиновых кислот или олигонуклеотидов, размещённых в определённом порядке. С помощью такого чипа можно наблюдать за структурой (геномикой) и функционированием (функциональной геномикой) всех генов в организме человека — всё это уже делается в лабораториях. Практически для медицинских целей необходимы упрощённые варианты чипов: для обнаружения разных вирусов и патогенных микроорганизмов [10, 13].

По прогнозу национального фонда науки США к 2015 г. годовой оборот рынка наноиндустрии достигнет 1 трлн долл.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования в области разработки пищевых нанотехнологий по следующим основным направлениям: производство наночастиц, нанонитей и нанокапсул, наноконпозиций для пищевых продуктов заданного состава с необходимыми органолептическими показателями, новых упаковочных материалов с использованием нанотехнологий, обеспечивающих высокую сохраняемость и безопасность готового продукта. На российском рынке представлены разработки в виде незагрязняющихся тканей и упаковок, позволяющих дольше сохранять исходные качества с.-х. продукции.

Перспективным направлением является использование фильтров и мембран на основе наноматериалов для очистки воды, соков, пива, вина и воздуха, опреснения морской воды. Наноагрегаты серебра используют в элементах для изготовления бактерицидных фильтров.

В растениеводстве применение нанопрепаратов, совмещённых с бактериородопсином, обеспечивает повышение урожайности в 1,52 раза и устойчивости к неблагоприятным усло-

виям почти всех продовольственных (картофель, зерновые, овощные, плодово-ягодные) и технических (хлопок, лён) культур. Нанотехнологии применяются в послеуборочной обработке подсолнечника, табака и картофеля, а также при хранении овощей и фруктов в регулируемой газовой среде [14].

### **РНК-маркёры на основе нанокolonий**

Около 15 лет назад в Институте белка РАН А.Б. Четвериним с сотрудниками экспериментально была показана способность молекул РНК формировать молекулярные колонии на гелях или других твёрдых средах, если на этих средах им были предоставлены условия для репликации (все четыре рибонуклеотидтрифосфата, катионы магния ( $Mg^{++}$ ) и фермент РНК-зависимая РНК-полимераза). Дальнейшие исследования этой же группы исследователей показали, что молекулы РНК при столкновении в водной среде могут спонтанно обмениваться частями, т.е. обладают способностью к неэнзиматической рекомбинации. Возможность легкого распространения молекул РНК через среду, в т.ч. атмосферную, также была продемонстрирована в прямых экспериментах [2].

В теоретическом отношении это открытие в контексте мировой научной концепции о рибозимах («РНК-мир») способствует возможности в корне пересмотреть теорию происхождения жизни на Земле. Смешанные колонии РНК на твёрдых или полутвёрдых носителях могли быть первыми эволюционирующими бесклеточными ансамблями, где одни молекулы выполняли генетические функции (репликацию молекул РНК всего ансамбля), а другие формировали необходимые для успешного существования структуры (например, такие, которые адсорбировали нужные вещества из окружающей среды) или были рибозимами,

ответственными за синтез и подготовку субстратов для синтеза РНК. Эта коммунальная форма существования мира РНК — своего рода «Солярис»

С. Лема — должна была очень быстро эволюционировать. В ходе этой молекулярной эволюции первую функцию РНК передала ДНК, а вторую — белкам. Что же стало с РНК после распада коммуны?

Хотя коммуна распалась, мир РНК сохранился в каждой клетке каждого живого организма. Основой современной жизни является наследуемый биосинтез белков, который определяет все признаки ныне существующих организмов. В качестве центрального звена этого процесса биосинтеза белков выступает совокупность взаимодействующих друг с другом молекул РНК различных типов, прежде всего рибосомной РНК, формирующей аппарат белкового синтеза, тРНК, доставляющей в рибосому активированные аминокислоты для построения полипептидных цепей белков, и мРНК, несущей в своей нуклеотидной последовательности программу для синтеза белка. Кроме этих трёх основных представителей внутриклеточного мира РНК обнаружен целый ряд некодирующих РНК (нкРНК).

Оказалось, что нкРНК выполняют множество функций с использованием не известных ранее механизмов: нкРНК участвуют в регуляции транскрипции генов, сплайсинге и регуляции деградации РНК. Они вовлечены в трансляцию и её регуляцию, в процессинг и модификацию рибосомной РНК, в защиту от вирусных инфекций и мутагенной активности мобильных генетических элементов, а также в ряд других процессов. РНК явно потеснили белки на пьедестале главных молекул, обеспечивающих жизнедеятельность клеток [15].

Можно сказать, что совокупность молекул РНК — мир РНК — по-прежнему составляет ядро жизни. Современная жизнь — это РНК,

передавая часть своих генетических функций рождённому ею же полимеру — ДНК и синтезирующая белки для всеобъемлющего эффективного функционирования содержащих её компонентов — клеток и многоклеточных организмов.

С практической стороны нанокolonии РНК в настоящее время составляют один из классов РНК-маркёров. Так как практически каждая нанокolonия происходит из одной матричной молекулы, с помощью нанокolonий можно обнаружить и идентифицировать одиночные молекулы ДНК и РНК, в т.ч. — с диагностическими целями. В настоящее время нанокolonии применяются в нашей стране и за рубежом для различных научных и прикладных задач. Важнейшим направлением исследований является разработка ранней диагностики онкологических заболеваний.

В России от разных видов рака умирает около 300 000 человек в год, что представляет большую демографическую, экономическую, социальную проблему. Лечение осложняется тем, что у большинства больных болезнь диагностируется уже на поздних стадиях [16]. С развитием экономики проблема может только усугубляться, так как частота онкологических заболеваний растёт по мере ухудшения экологической обстановки и увеличения продолжительности жизни населения. Эффективность лечения рака зависит от своевременности диагностики. Однако до сих пор проблема ранней диагностики рака не решена.

Нанокolonии РНК позволяют создать технологию молекулярной диагностики рака на стадии, когда его ещё невозможно обнаружить существующими методами. Диагностировать болезнь предполагается путём обнаружения в клинических образцах (например, в крови, в моче или в мокроте) молекул определённых индикаторных («маркёрных») РНК,

которые присутствуют во всех раковых клетках независимо от вида рака. Примером такого универсального маркёра является мРНК белковой субъединицы теломеразы — фермента, отвечающего за синтез концевых участков хромосом (теломер). Эта мРНК присутствует и в нормальных стволовых клетках, которые, подобно раковым клеткам, способны к неограниченному делению. Однако в отличие от раковых клеток стволовые клетки находятся в своих нишах и не распространяются по организму. Поэтому присутствие теломеразной мРНК там, где стволовых клеток быть не должно (например, в плазме или в клетках крови), может служить указанием на наличие злокачественного процесса. Существуют также РНК, которые могут служить групповыми маркёрами всех видов рака кишечника, молочной железы, печени. Попытки использовать РНК-маркёры для молекулярной диагностики рака были и раньше, но из-за ограниченной чувствительности и недостаточной специфичности стандартной ПЦР (полимеразной цепной реакции) они закончились неудачей.

Следует отметить исключительно высокий потенциал нанокolonий для диагностики любых заболеваний, для которых существуют РНК- или ДНК-маркёры, в т.ч. инфекционных и генетических, а также мониторинга окружающей среды, решения задач судебной медицины, обнаружения следовых количеств генетически модифицированных организмов. Более того, нанокolonии могут быть использованы для детекции молекул, отличных от РНК или ДНК. Например, молекула белка (в т.ч. белка-маркёра рака) может быть обнаружена путём размножения суррогатной ДНК-мишени, образованной лигированием фрагментов ДНК, способных одновременно связываться с данной молекулой белка посредством специфических лигандов (например, антител).

Подобным же образом с помощью нанокolonий можно обнаружить одиночные молекулы любого вещества (например, наркотика или допинга), достаточно сложные для формирования на своей поверхности, по крайней мере, двух участков специфического связывания лигандов [16].

#### **Золотые наночастицы для генетико-физиологической диагностики**

Во всех описанных направлениях нанобиотехнологических разработок перспективным является использование коллоидного золота. Золото — один из первых открытых человеком металлов. Первые сведения о коллоидном золоте (КЗ) обнаружены в трактатах китайских, арабских и индийских учёных, которые уже в III-X веках синтезировали КЗ и использовали его, в частности, в лечебных целях. Научное исследование проблем получения и использования КЗ началось в середине XIX века, когда в научную литературу был введён термин «коллоидный раствор». В 1857 г. вышла статья Майкла Фарадея, которая стала основополагающей научной работой, посвящённой изучению способов синтеза и свойств КЗ. В этой статье Фарадей впервые описал агрегацию КЗ в присутствии электролитов, защитный эффект желатины и других высокомолекулярных соединений, свойства тонких плёнок высушенного КЗ. Приготовленные им растворы КЗ хранятся в Лондонском королевском институте до настоящего времени [12].

Что такое плазмонный резонанс? Высокая электронная плотность, способность рассеивать и излучать вторичные электроны, характерное поглощение и рассеяние в видимой области светового спектра электромагнитных излучений, интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяют легко обнаруживать золотые частицы с применени-

ем различных методик исследования (микроскопия, фотометрия, проточная цитометрия и др.). Кроме того, возможность получения зольей золота с различными размерами частиц и их узким распределением обеспечивает высокое разрешение и позволяет проводить мечение по двум и более антигенам или иным лигандам.

Среди наноразмерных структур, фундаментальное исследование которых сейчас активно развивается, большой интерес вызывают кластеры (от лат. *cluster* — гроздь) — образования, в которых число атомов варьирует от единиц до десятков и сотен тысяч. Кластеры занимают промежуточную область между отдельными атомами и твёрдыми телами и соответственно проявляют свойства, отличные от тех и других. Физические характеристики кластеров существенно зависят от вида входящих в них атомов и их числа. Среди кластеров простых веществ особое место занимают металлические кластеры (типичный пример — золотые наночастицы). Пристальное внимание к ним объясняется, с одной стороны, особенностями их электронной структуры, а с другой — относительной простотой их получения для экспериментальных исследований.

Началом современного этапа развития физики металлических кластеров можно считать экспериментальное открытие у них в 1993 г. оболочечной структуры атомов. Практически одновременно с первыми экспериментальными результатами существование электронных оболочек в многоатомных кластерах было описано теоретически. В основу теоретического подхода было положено свойство валентных электронов металла покидать свои атомы (делокализовываться) и образовывать зону проводимости. Оказалось, что именно эти обобществлённые электроны ответственны за подобную энергетическую структуру кластера. Более того, их

поведение определяет большинство необычных «коллективных» свойств кластеров.

Делокализованные электроны в металлическом кластере определяют не только их структуру, но и характер поведения кластера в процессах взаимодействия с внешними полями. Так, в результате исследований процессов взаимодействия металлических кластеров с электромагнитным полем, которые интенсивно проводятся в последние годы, было обнаружено, что в спектрах поглощения электромагнитной энергии наблюдаются гигантские максимумы — резонансы. Эти резонансы связаны с возбуждением коллективных колебаний электронной системы, аналогичных колебаниям электронного газа в плазме и макроскопических металлических телах. Такие колебания носят названия плазмонных, а резонанс — поверхностным плазмонным резонансом. Причём амплитуда и частотный диапазон плазмонного резонанса в кластерах отличаются от таковых в макроскопических кристаллах.

Если частицы формируют агрегаты, соответствующий плазмонный пик сдвигается в сторону длинных волн или уширяется в результате диполь-дипольного взаимодействия индуцированных светом дипольных моментов частиц в агрегате. Таким образом, оптические возбуждения в агрегате из металлических наночастиц имеют коллективную природу (делокализованы по многим мономерам). Поэтому полоса поглощения в области плазмонного резонанса электронов проводимости частиц изменяется специфическим образом. Локальные оптические поля, действующие на металлическую частицу во фрактальном агрегате, могут значительно превышать среднее поле, что приводит к гигантским нелинейным эффектам. Принципиально важно отметить, что на оптический отклик от наночастиц или их агрегатов (особенно упорядоченных) су-

щественно влияют размер и форма частиц, межчастичное расстояние, а также свойства их локального диэлектрического окружения. Это даёт возможность управлять «настройкой» сенсоров [12].

Как используется коллоидное золото в целях диагностики? В России нанобиотехнология на основе коллоидного золота развивается в основном в институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) и Саратовском государственном университете, где была разработана технология синтеза золотых наносфер с диаметром от 3 до 100 нм и их функционализация биоспецифическими макромолекулами, защищённая патентом РФ (№2013374). Номенклатура биомолекул-зондов, используемых для синтеза маркеров, включает антитела и миниантитела, одонитевые нуклеотиды, ферменты, лектины, биотин и биотинилированные производные биомолекул.

Конъюгаты наночастиц коллоидного золота с биоспецифическими макромолекулами широко применяются в иммунохимических исследованиях с использованием световой и электронной микроскопии, твёрдофазного иммуноанализа. Благодаря своим свойствам препараты коллоидного золота превосходят аналоги (конъюгаты с ферментными, изотопными, флуоресцентными метками) по чувствительности, простоте, скорости и стоимости. В последние годы наблюдается явный «бум» в количестве публикаций по использованию металлических наночастиц (прежде всего золота и серебра) для детекции биоспецифических межмолекулярных взаимодействий, в т.ч. в различных устройствах типа биочипов и биосенсоров [12, 16].

На пути к широкомасштабному использованию РНК-маркёров в растениеводстве. Особую актуальность методы и подходы нанонауки приобрели в познании механизмов регуляции генной экспрессии у растений,

что является одной из центральных проблем современной молекулярной биологии. От состояния изученности этой проблемы зависят успехи использования достижений молекулярной биологии (различного рода молекулярные маркеры, трансгенные растения) в решении важнейших задач растениеводства.

Однако до 90-х годов XX века результаты исследований здесь были достаточно скромными. Причина тому — сложность систем регуляции у эукариот и недостаток модельных объектов, изучение которых позволило бы эффективно разобраться в принципах саморегуляции растительного организма. Но в конце прошлого столетия был открыт ряд явлений, не только позволивших продвинуться в понимании этих проблем, но и сделавших возможным применение на практике знаний о механизмах регуляции экспрессии генов. Все эти явления были связаны с посттранскрипционной регуляцией экспрессии генов эукариот на уровне регуляции времени жизни (стабильности) РНК клетки.

Рибонуклеиновые кислоты являются центральным звеном живой материи, так как обладают свойствами матрицы, подобно ДНК, и ферментативными свойствами, подобно белкам-энзимам (рибозимы). Эти особенности в значительной степени определяются наличием (до 4-6%) в составе молекул РНК катионов магния ( $Mg^{++}$ ), т.е. реально РНК существует в клетке только в виде магниевой соли рибонуклеиновой кислоты. Катионы магния являются структурообразующими ионами и в то же время факторами, определяющими рибозимные свойства РНК [4, 5].

В основу наших исследований положено явление генетико-физиологической детерминации магнийзависимого распада мРНК злаков *in vitro* — система *ommp*, которая является оригинальной разработкой лаборатории молекулярной биологии Краснодар-

ского НИИСХ имени П.П. Лукьяненко. Система *ommp* — это простейшая система *in vitro*, адекватно отражающая относительную стабильность мРНК в живой клетке (*in vivo*) и состоящая только из трех компонентов: РНК + вода +  $Mg^{++}$ . Как известно, РНК в клетке находится в виде магниевой соли и содержит до 5% магния ( $Mg^{++}$ ). Если РНК выделять из растительной ткани в присутствии катионов магния и в условиях, способствующих сохранению этих катионов в составе молекулы РНК, то распад последней в системе *ommp* происходит аналогично соответствующему процессу *in vivo* и отражает особенности взаимодействия генотип - среда. На протяжении последних сорока лет многие исследователи отмечали способность выделенной из клетки РНК разрушаться в присутствии катионов металлов. Но от внимания исследователей ускользал тот факт, что разрушение происходит по тем же законам, что и в живой клетке, отражая генетические особенности и физиологическое состояние организма [17].

Основным результатом селекции является изменение нормы реакции организма на факторы окружающей среды. Исследование молекулярно-биологических закономерностей формирования эффекта взаимодействия генотип - среда наиболее целесообразно на основе изучения центрального и самого лабильного компонента посттранскрипционной регуляции экспрессии генов — дифференциальной стабильности мРНК различных генов растений и её варибельности в зависимости от условий окружающей среды с использованием системы *ommp*, позволяющей относительно просто *in vitro* оценивать время полужизни мРНК и пределы её изменчивости. Однако относительная простота метода *ommp*-системы существенно обесценивается сложностью существующих методов детекции количества ген-специфических мРНК (дот-блот,

Норзерн-блот, количественный ОТ-ПЦР), что является фактором, ограничивающим развитие исследований в этом направлении. Поэтому имеет принципиальное значение использование для этой цели возможностей, предоставляемых нанобиотехнологией. Достижения в этой области науки уже в настоящее время позволяют ставить вопрос о разработке простого, оперативного и высокочувствительного количественного метода определения ген-специфических мРНК растений, основанного на использовании конъюгатов коллоидного золота (КЗ) с ген-специфическими олигодезоксирибонуклеотидными зондами (оДНК).

В 1996 г. группой американских исследователей [18] был предложен принцип создания конъюгатов наночастиц коллоидного золота (КЗ) с ген-специфическими олигодезоксирибонуклеотидами (оДНК), несущими на одном из своих концов SH-группы, способные взаимодействовать с золотыми наночастицами (SH-оДЫК) с образованием своеобразных молекулярных ежей. Применение смеси двух или трёх типов подобных ежей, различающихся специфическими SH-оДЫК, комплементарными к разным частям определённой мишени молекулы ДНК, приводит к формированию упорядоченной пространственной структуры в растворе, содержащем все перечисленные компоненты. Это определяет изменение оптических свойств наночастиц коллоидного золота в видимой части спектра (530 нм).

Мы применили этот принцип для оценки количества ген-специфических мРНК. В этих целях использовали модельную систему на основе мутации регуляторного гена *opaque-2*, глобально снижающей содержание мРНК запасного белка (зеин 22 кДа) в зерне кукурузы линии Висконсин 64А (около 5% от уровня содержания этой мРНК в зерне кукурузы дикого типа). Для получения конъюга-

тов КЗ-БН-оДНК использовали золи КЗ с диаметром частиц 15 нм и три различных 20-звенных тиолированных о ДНК (фирма Syntol, Москва), специфичных к трём определенным участкам молекулы мРНК зеина 22 кДа. Смесь равных количеств суммарной высокополимерной РНК из созревающего зерна (20-е сутки после опыления) обычной или *opaque-2* кукурузы и конъюгатов КЗ-БН-оДНК инкубировали при  $-10^{\circ}\text{C}$ , а затем после оттаивания, изучали зависимость экстинкции при длине волны 530 нм от количества добавляемой РНК. Метод позволял получить хорошее совпадение в оценке количества мРНК зеина 22 кДа в РНК из зерна *opaque-2* кукурузы, но «зашкаливал» при применении в исследовании аналогичных количеств суммарной высокополимерной РНК из созревающего зерна обычной кукурузы, что доказывало специфичность метода [19, 20].

Также получена хорошая количественная зависимость содержания в растворе полиадениловой кислоты при гибридизации с КЗ-ЗН-олиго(дТ). Был синтезирован маркер КЗ-15-Т<sub>28</sub> — комплекс наночастиц коллоидного золота (средний диаметр 15 нм) с тиолмодифицированными олиготимидиновыми молекулами (зондами), содержащими 28 нуклеотидов. Описан принцип спектрофотометрического контроля всех этапов приготовления маркера и применения спектров поглощения в УФ и видимой областях для выявления реакции гибридизации *in vitro*.

В частности, показано, что величины поглощения нуклеиновых кислот и наночастиц золота в составе маркера складываются не аддитивно и в области поглощения нуклеотидов (260 нм), и в области плазмонного резонанса коллоидного золота (520 нм). Число олигонуклеотидов, химически связанных с одной наночастицей золота (=140), оценено по

данным спектрального анализа маркера и супернатанта промежуточного продукта. Синтетический маркер специфически окрашивал молекулы-мишени полиадениловой кислоты в дот-гибридизации на мембранном фильтре, но не окрашивал контрольные молекулы полиуридилевой кислоты. При гибридизации маркера с контролем и молекулами-мишенями в растворе спектральные изменения не зарегистрированы.

Применение циклов замораживания - оттаивания показало наличие изменений в плазмонном резонансе маркера в присутствии молекул полиадениловой кислоты. Эти эффекты объяснены в рамках агрегационной модели, отличной от модели перекрёстных сшивок [21, 22]. Важно отметить, что полиадениловая кислота играет центральную роль в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, так как вариация длины полиадениловой последовательности на 3'-конце молекулы мРНК определяет как её стабильность, так и её трансляционную активность под влиянием изменяющихся факторов среды [4, 5, 6].

Таким образом, нами были получены принципиальные доказательства того, что колориметрический метод с применением наночастиц КЗ-БН-оДНК позволяет оценить количество ген-специфической мРНК в препарате суммарной высокополимерной РНК с чувствительностью, близкой к чувствительности радиоизотопного метода, без синтеза комплементарной ДНК в отличие от метода ОТ-ПЦР, что делает оценку количества индивидуальной мРНК более простой и более дешёвой [22].

Комбинация этого метода с методом ПЦР позволяет резко снизить стоимость анализа методом ПЦР в целях диагностики, так как позволяет оценить количество ампликонов уже после первого (из 25-30) цикла ПЦР при помощи соответствующих конъю-

гатов коллоидного золота [23]. Кроме того, чувствительность (эффективность) самого метода ПЦР может быть резко увеличена (до 10 000 раз) при помощи коллоидного золота, снижающего неспецифическое взаимодействие праймеров-нуклеотидов [25].

В мировой науке высокая чувствительность и селективность молекулярного узнавания, основанная на комплементарных ДНК-ДНК, ДНК-РНК взаимодействиях в совокупности с уникальными оптическими свойствами плазмонно-резонансных наночастиц коллоидных систем благородных металлов, положили начало созданию нового раздела междисциплинарной науки — молекулярной нанотехнологии [24, 25, 26].

Существенный интерес представляет способность одноцепочечных нуклеиновых кислот (преимущественно РНК) предотвращать агрегацию золотых нефункционализированных наночастиц. Это происходит, вероятно, за счёт электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группировками нуклеиновых кислот и высокополяризованными золотыми наночастицами, что является перспективным в исследовании экспрессии генов и разработки на этой основе новых методов диагностики биологических свойств организмов [27]. Кроме того, наночастицы коллоидного золота могут быть функционализированы на специфическое взаимодействие с определенными катионами, что существенно упрощает методики определения их количества в аналитических пробах [28, 29].

## Заключение

На многих объектах показано, что переход от макро- к наноразмерам приводит к появлению качественных изменений физико-химических свойств различных соединений и получению на их основе наносистем. На рубеже XX и XXI веков мы являемся свидетелями и

участниками формирования и развития новой области знаний — нанонауки.

Нанонаука состоит из нескольких отдельных самостоятельных направлений. Как часто это бывает, выражена тенденция рассматривать раздельно фундаментальные и прикладные направления. Однако современные темпы развития научных исследований практически стирают грани и сроки между открытием новых явлений и их практическим использованием. Фундаментальные исследования должны быть направлены на решение определённых практических задач. Одновременно совершенно ясно и другое: конкретные прикладные применения невозможны без серьёзных и глубоких, чисто научных исследований. Возникновение и

развитие нанонауки отвечает современному развитию естествознания.

Важно отметить ещё одну особенность, связанную с развитием нанонауки, — её междисциплинарность. Здесь тесно переплетаются интересы, подходы и методы исследований физики, химии, биологии и материаловедения. Успешное развитие различных направлений нанонауки в условиях подобной многоплановости предполагает организацию сотрудничества учёных разных специальностей в рамках единой общей задачи или программы. Междисциплинарность нанонауки требует изменения и совершенствования обучения и подготовки специалистов для работы в новом направлении, которое будет определять развитие естествознания в XXI веке.

#### Библиографический список

1. *Watson J.D.* A structure of deoxyribose nucleic acids / J.D. Watson, F.H.C. Crick // *Nature*, 1953. V. 171. P. 737-738.
2. *Спирин А.С.* Рибонуклеиновые кислоты как центральное звено живой материи // *Вестник Российской академии наук*, 2003. Т. 73. № 2. С. 117-127.
3. *Киселёв Л.И.* Молекулярная биология от 1970 до 2000 и дальше // *Биоорганическая химия*, 2000. Т. 26. № 10. С. 767-771.
4. *Плотников, В.К.* Закономерный распад РНК in vivo и in vitro — основа новых методов биотехнологии // *Наука Кубани*, 2007. № 4. С. 4-15.
5. *Плотников В.К.* Генетический контроль и экологическая обусловленность стабильности мРНК в клетках эукариот // *Известия ТСХА*, 2007. Вып. 5. С. 110-119.
6. *Патрушев Л.И.* Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. М.: Наука, 2000.
7. *Плотников В.К.* Сорт озимой пшеницы Краснодарская 39 — источник открытий в молекулярной биологии растений // *Пшеница и тритикале: Сб. науч. ст. Краснодар*. 2001. С. 611-616.
8. *Плотников В.К.* Интегральная молекулярная биология — новая ступень познания явлений жизни // *Эволюция научных технологий в растениеводстве: Сб. науч. ст. Краснодар*, 2004. Т. 3. С. 22-28.
9. *Taniguchi N.* On the basic concept of nanotechnology // *Proc. Intern. Conf. Eng. Tokyo: Jap.Soc.Prec.Eng.*, 1974. P. II. P. 18-23.
10. *Глазко В.И., Белонухов С.Л.* Нанотехнологии и наноматериалы в сельском хозяйстве / Под ред. чл.-корр. РАСХН В.М. Баутина. М.: Изд-во РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, 2008.
11. *Сергеев Г.Б.* Нанохимия / Г.Б. Сергеев. М.: Изд-во МГУ, 2003.
12. *Дыкман Л.А.* Золотые наночастицы / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырёв, С.Ю. Щёголев, Н.Г. Хлебцов. М.: Наука, 2008.
13. Нанонаука в Сибири: наноматериалы, наноэлектроника и нанобиотехнологии [электронный ресурс]: режим доступа: <http://www.nanoware.ru/forum/showthread.php? = 165>.
14. Нанобиотехнологии в сельском хозяйстве [электронный ресурс]: режим доступа: <http://www.proovosh.myl.ru/news/2008-03-01-2>.
15. *Макарова Ю.А.* Некодирующие РНК / Ю.А. Макарова, ДА. Крамеров // *Биохимия*, 2007. Т. 72. № И. С. 1427-1447.
16. Нанобиотехнологии в России (редакционная статья) // *Российские нанотехнологии*, 2008. Т. 3. № 3-4. С. 29-53.

17. *Плотников В.К.* Генетико-физиологическая детерминация распада мРНК злаков in vitro // Успехи современной биологии, 2003. Т. 123. Вып. 1. С. 98-109.
18. *Mirkin Ch.A.* ADNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials / Ch. A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff // Nature, 1996. V. 382. P. 607-609.
19. *Богатырев В.А.* Метод дифференциальной спектроскопии рассеянного света для исследования биоспецифических реакций в системах конъюгатов золотых наночастиц с белками или олигонуклеотидами / В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, Я.М. Краснов, В.К. Плотников, Н.Г. Хлебцов // Коллоидный журнал, 2002. Т. 64. № 6. С. 745-755.
20. *Плотников В.К.* Колориметрическая оценка количества мРНК зеинов созревающего зерна кукурузы при помощи конъюгатов коллоидного золота с генспецифическими олигодезоксирибонуклеотидами / В.К. Плотников, В.А. Богатырёв, Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов, О.И. Соколов // Материалы V съезда общества физиологов растений России и международной конференции «Физиология растений — основа фитобиотехнологии». Пенза, 2003. С. 469-470.
21. *Богатырев В.А.* Оптические свойства конъюгатов коллоидного золота с олиготимидином и их изменение при реакции гибридизации с полиадениловой кислотой / В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, Б.Н. Хлебцов, В.К. Плотников, Н.Г. Хлебцов // Коллоидный журнал, 2005. Т. 67. № 4. С. 413-421.
22. *Богатырёв В.А.* Нанобиотехнологический метод оценки количества генспецифической мРНК / В.А. Богатырёв, Л.А. Дыкман, Я.Ю. Евтушенко, В.К. Плотников, Н.Г. Хлебцов // Материалы IV съезда общества биохимиков и молекулярных биологов России. Новосибирск, 2008.
23. *Doria G.* Nanodiagnosics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorfism/mutation detection/mutation detection / G. Doria, R. Franco, P. Baptista // IET Nanobiotechnol, 2007. V. 1, № 4. P. 53-57.
24. *Baptista P.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods / P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, R. Franco // Anal. Bioanal. Chem, 2008. V. 391. № 3. P. 943-950.
25. *Li M.* Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles / M. Li, Yu-Ch. Lin, Ch.-Ch. Wu, Hs-Sh. Liu // Nucleic Acids Research, 2005. V. 33. № 21. P. 1-10.
26. *Csaki A.* DNA-based Molecular Nanotechnology / A. Csaki, G. Maubach, D. Born, J. Reichert, W. Fritzsche // Singl Mol, 2002. V. 3, № 5-6. P. 275-280.
27. *Goto T.* Self-assembled spherical aggregates of gold nanoparticles and their network ensembles mediated by metal ion recognition / T. Goto, H. Fujihara // Journal of materials science, 2004. V. 39. P. 2171-2173.
28. *He X* Gold Nanoparticle-Based Fluorometric and Colorimetric Sensing of Copper (II) Ions / X. He, H. Liu, Y. Li, N. Wang, J. Xiao, X. Xu, D. Zhu // Adv. Mater, 2005. V. 17. P. 2811-2815.
29. *Bates A.D.* Contraction and Characterization of a Gold Nanoparticle Wire Assembled Using Mg<sup>2+</sup>-Dependent RNA-RNA Interactions / A.D. Bates, B.P. Callen, J.M. Cooper, R. Cosstick, C. Geary, A. Glidle, L. Jaeger, L. Pearson, M. Proupin-Peres, C. Xu, R.S. Cumming // Nano Letters, 2006. V. 6. № 3. P. 445-448.

*Рецензент* — д. с.-х. н. В.И. Глазко

#### SUMMARY

Nanobiotechnology is a rapidly advancing area of scientific and technological opportunity that applies the tools and processes of nano/micro range to build devices for studying biosystems. The impact of achievements in nanobiotechnology is particularly relevant to biodiagnosics, where nanoparticle-based assay has been developed for specific detection of bioanalytical and clinical interest. A short review of our own and literature data on synthesis, optical properties, functionalization and applications of plasmon-resonant nanoparticles is given in the article.

*Key words:* nanobiotechnology, nanoparticles, biodiagnosics, biosystems

**Плотников Владимир Константинович** — д. б. н., КНИИСХ имени П.П. Лукьяненко. Тел. 222-69-14. Эл. почта: [vkpbio@mail.ru](mailto:vkpbio@mail.ru).