



(51) МПК

[C12N 15/00 \(2006.01\)](#)[B82B 3/00 \(2006.01\)](#)[C01G 49/00 \(2006.01\)](#)[C01G 51/00 \(2006.01\)](#)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 14.02.2023)

Пошлина: учтена за 11 год с 30.07.2023 по 29.07.2024. Установленный срок для уплаты пошлины за 12 год: с 30.07.2023 по 29.07.2024. При уплате пошлины за 12 год в дополнительный 6-месячный срок с 30.07.2024 по 29.01.2025 размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2013135524/10](#), 29.07.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 29.07.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.07.2013

(45) Опубликовано: [20.02.2015](#) Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: PRODELALOVA J. et al, Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles, Journal of Chromatography A, 2004, v. 1056, p. 43-48, реферат, стр. 43-47. ПЕРШИНА А.Г., Взаимодействие наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК in vitro, автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Новосибирск,

2011,22с. RU 2471502 C1, 10.01.2013. SYKOYAN M.A. et al, Magnetofection of Human Somatic Cells with Magnetite and Cobalt Ferrosinell Nanoparticles, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2013, v. 154, n. 5, p. 673-676

Адрес для переписки:

634021, г.Томск, пр. Академический, 10/3, Отдел структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН, Руководителю патентной группы Юрковой Л.А.

(72) Автор(ы):

Першина Александра Геннадиевна (RU),  
Сазонов Алексей Эдуардович (RU),  
Итин Воля Исаевич (RU),  
Магасва Анна Алексеевна (RU),  
Терехова Ольга Георгиевна (RU),  
Найден Евгений Петрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Томский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТНЦ СО РАН) (RU),  
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России) (RU)

## (54) БИОНАНОКОНЬЮГАТ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к созданию конъюгатов магнитная частица - нуклеиновая кислота, и может быть использовано для молекулярно-генетической диагностики. Бионаноконъюгат включает наноразмерную суперпарамагнитную частицу кобальтовой феррошпинели  $Co_xFe_{3-x}O_4$ , где  $0.6 \leq x \leq 0.98$ , полученную механохимическим синтезом. Для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго- или поли-A/dA последовательность, используют синтетический одноцепочечный олигонуклеотид  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , один участок которого, состоящий из гуаниновых нуклеотидов, в присутствии фосфат-анионов в растворе специфически связан с поверхностью наночастицы, а другой - состоящий из тиминных нуклеотидов, способен вступать в гибридизацию с олиго- или поли-A/dA нуклеотидными последовательностями. Для выделения из раствора в присутствии фосфат-анионов специфической гетеронуклеотидной последовательности дополнительно используют молекулу олигонуклеотида-адаптера, содержащую последовательность олиго- $dA_x$  на 3'-конце, гибридизованную с тиминными нуклеотидами комплекса  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и участок на 5'-конце, комплементарный специфической гетеронуклеотидной последовательности в растворе. Изобретение позволяет эффективно обнаруживать и выделять одноцепочечные нуклеиновые кислоты. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 8 ил., 1 табл., 5 пр.

Изобретение относится к биологии и медицине, а именно к созданию конъюгатов магнитная частица - нуклеиновая кислота, необходимых для молекулярно-генетической диагностики.

Создание новых эффективных систем и бионаногибридных конструкций для

диагностики различных заболеваний и решения ряда других проблем представляет собой важнейшее направление современной медицины и биологии. Одной из главных задач при этом является создание конъюгатов, в частности, для последующего обнаружения и выделения из различных органов и тканей генетического материала (ДНК, РНК), на основе исследования которого и будет поставлен диагноз. Методы обнаружения и выделения нуклеиновых кислот должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью, быть простыми и быстрыми, давать воспроизводимые результаты и обеспечивать высокую чистоту ДНК/РНК.

Наиболее перспективным методом обнаружения и выделения нуклеиновых кислот является метод магнитной сепарации, в котором в качестве сорбентов выступают магнитные наночастицы, смешанные в растворе с биологическими структурами и образующие с последними конъюгаты. В большинстве случаев такие частицы состоят из оксидов железа, поверхность которых покрыта различными веществами и функциональными группами, способствующими образованию конъюгатов. При наложении магнитного поля с достаточно большим градиентом магнитные частицы, создающие конъюгаты с нуклеиновыми кислотами (ДНК/РНК), могут быть отделены из раствора и подвергнуты дальнейшей обработке.

Основные преимущества использования магнитных наночастиц для систем обнаружения и выделения нуклеиновых кислот обусловлены следующим:

- магнитные наночастицы являются однодоменными, обладают суперпарамагнитным поведением и магнитными свойствами, необходимыми для выделения биологических объектов с помощью внешнего магнитного поля.

Задачей настоящего изобретения является создание бионаноконъюгата с высокой степенью селективности для выделения одноцепочечных специфических нуклеиновых кислот из раствора.

Поставленная задача решается тем, что в качестве основы бионаноконъюгата берут наноразмерную суперпарамагнитную частицу кобальтовой феррошпинели  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , где  $0.6 < x \leq 0.98$ , полученную методом механохимического синтеза (RU 2471502, 2013), и для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго- или поли-A/dA последовательность, используют синтетический одноцепочечный олигонуклеотид  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , один участок которого, состоящий из гуаниновых нуклеотидов, в присутствии фосфат-анионов в растворе специфически связан с поверхностью наночастицы, а другой - состоящий из тиминных нуклеотидов, способен вступать в гибридизацию с олиго- или поли-A/dA нуклеотидными последовательностями, а для выделения из раствора, содержащего фосфат-анионы, специфической гетеронуклеотидной последовательности используют молекулу олигонуклеотида-адаптера, содержащую последовательность олиго-dA<sub>x</sub> на 3'-конце, гибридизованную с тиминными нуклеотидами комплекса  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и участок на 5'-конце, комплементарный специфической нуклеотидной последовательности в растворе.

При  $n < 5$  связывание наночастицы с нуклеиновой кислотой является слабым. При  $n > 30$  доля выделенного продукта практически не изменяется и, таким образом, дальнейшее увеличение числа гуаниновых нуклеотидов не приводит к существенным преимуществам. Соответственно при  $m < 10$  связь между олигоdT-«хвостом» бионаноконъюгата и комплементарной нуклеиновой кислотой является нестабильной при нормальных условиях (нестабильность формирующегося за счет водородных связей А-Т двухцепочечного гибрида при комнатной температуре), а при  $m > 35$  возникают трудности при последующем отделении выделяемой нуклеиновой кислоты от бионаноконъюгата (высокая температура плавления А-Т-связей).

По сравнению с другими техническими решениями предложенный бионаноконъюгат имеет преимущества, которые состоят в следующем:

а) Для создания бионаноконъюгатов используют наночастицы кобальтовой феррошпинели  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , где  $0.6 \leq x \leq 0.98$  со средним диаметром в интервале 3-11 нм, полученные методом механохимического синтеза и обладающие суперпарамагнитным поведением.

В отличие от других методов химической конденсации при механохимическом синтезе воздействие интенсивной деформации (удар, трение) приводит к формированию в наночастицах «активных» неравновесных состояний, для которых характерны высокие упругие микронапряжения ( $\Delta d/d = (5.4-7.4) \cdot 10^{-3}$ ), нарушения степени порядка в расположении разнородных ионов, изменение параметров решетки, аморфизация поверхностного слоя. Кристаллическая решетка таких наночастиц отличается большими смещениями ионов, химический состав в основном соответствует нестехиометрии, поэтому полученные механохимическим синтезом наночастицы обладают большой запасенной энергией и являются метастабильными и «активными». Можно полагать, что наличие «активных» неравновесных состояний облегчает образование конъюгатов между ДНК и катионами металлов на поверхности наночастицы.

Установлено, например, что по эффективности переноса ДНК в клетки *in vitro* при магнитофекции наночастицы, синтезированные механохимическим методом, заметно превосходят такие же по размеру наночастицы, полученные методом химического осаждения (M.A. Sukoyan, E.A. Khrapov, E.N. Voronina et.al. *Magnitofection of Human Somatic Cells with Magnetite and Cobalt Ferrosphenel Nanoparticles/Bulletin in Experimental Biology and Medicine*. 2013, v.154, №5, March, pp. 673-676).

б) Магнитная наночастица кобальтовой феррошпинели не требует покрытия, широко используемого в других технических решениях, так как предложенный химически синтезированный олигонуклеотид осуществляет прямое связывание непосредственно с поверхностью наночастицы за счет участка, представленного повтором из гуаниновых нуклеотидов. Применение магнитных наночастиц без покрытия приводит к повышению магнитных свойств, которые обычно снижаются при нанесении покрытий, увеличивает площадь поверхности для связывания с биомолекулами и позволяет более легко создать коллоидную систему. Одновременно в результате данной функционализации достигается блокирование адсорбционно-активных центров в отношении нуклеиновых кислот на поверхности наночастицы.

Установлено, что в случае использования наночастиц без покрытия процедура экстракции является простой, быстрой, дешевой и надежной, не требует применения органических растворов и ее можно легко автоматизировать (Saiyed Z.M., Ramchand. *Extraction of Genomic DNA Using Magnetic Nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) as a Solid-Phase Support/Americal Journal of Infectious Diseases* 3(4): 225-229, 2007; Saiyed Z.M., Ramchand C.N., Telang S.D. *Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support/J. Phys.: Condens. Matter*, v.20 (2008) 204153).

в) Предлагаемый бионаноконъюгат обеспечивает высокую степень селективности, близкую к 100% при выделении олиго- или поли A/dA нуклеотидных последовательностей из раствора, содержащего фосфат-анионы в концентрации  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л. После дополнительного присоединения молекулы-«адаптера» биоконъюгат обеспечивает такую же степень селективности при выделении специфических гетеронуклеотидных последовательностей. При этом важную роль играют фосфат-анионы, которые в выбранной концентрации предотвращают неспецифическое связывание.

Способ получения бионаноконъюгата для выделения одноцепочечных нуклеиновых кислот, заключающийся в том, что для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго- или поли-A/dA последовательность, берут наночастицы суперпарамагнитной кобальтовой феррошпинели  $Co_xFe_{3-x}O_4$ , где  $0.6 \leq x \leq 0.98$ , полученные механохимическим синтезом, наночастицы промывают дистиллированной водой, готовят водную суспензию отмытых наночастиц, суспензию разделяют на фракции в виде осадка и надосадка, отбирают надосадок и смешивают с ним синтетический одноцепочечный олигонуклеотид  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и фосфат натрия в концентрации  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л, после чего смесь инкубируют до установления полного адсорбционного равновесия и выделяют бионаноконъюгат методом магнитной сепарации с последующим центрифугированием и промыванием, а для выделения гетеронуклеотидной последовательности в раствор, содержащий наночастицы кобальтовой феррошпинели, связанные с синтетическим одноцепочечным олигонуклеотидом  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и фосфат натрия в концентрации  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л, добавляют молекулы олигонуклеотида-«адаптера», содержащие последовательность олиго-dA<sub>x</sub> на 3'-конце и участок на 5'-конце, комплементарный специфической гетеронуклеотидной последовательности в растворе, после чего смесь вновь инкубируют до установления полного адсорбционного равновесия и выделяют бионаноконъюгат методом магнитной сепарации с последующим центрифугированием и промыванием. При этом  $n$  предпочтительно равно = 20-25, а  $m$  предпочтительно равно 15-25.

Концентрационные границы содержания фосфата натрия в буферном растворе определяются следующими соображениями. При содержании фосфата натрия менее  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л участок олигонуклеотида, представленный тиминовыми нуклеотидами, может вступать в связывание с поверхностью наночастицы. Повышение концентрации фосфата натрия в растворе выше  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л может приводить к снижению плотности покрытия поверхности наночастицы.

Пример 1. Получение бионаноконъюгата.

Для приготовления суспензии вносят суперпарамагнитные наночастицы кобальтовой феррошпинели  $Co_{0.9}Fe_{2.1}O_4$ , полученные механохимическим синтезом, в 10 мМ трис (pH 5.0) до конечной концентрации 0.2 мг/мл. Обработывают суспензию 20 минут ультразвуком при частоте 22 кГц, мощности 25 Вт (Bandelin Sonopuls HD 2070) и центрифугируют при 13400 об/мин в течение минуты (Eppendorf MiniSpin) для осаждения агрегатов наночастиц. Отбирают надосадочную часть, представляющую собой суспензию наночастиц кобальтовой феррошпинели с концентрацией 0.15 мг/мл (pH 6.5).

Для получения бионаноконъюгата к 8/10 частей полученной суспензии наночастиц добавляют 1/10 объема водного раствора соответствующего олигонуклеотида состава  $dG_{18}dT_{25}$  с концентрацией  $50 \cdot 10^{-6}$  моль/л и 1/10 объема 10x фосфатно-солевого буфера (PBS) (10xPBS: 1.37 М NaCl, 0.027 М KCl, 0.1 М  $Na_2HPO_4$ , 0.02 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) и перемешивают на вортексе (BioSan FV-2400). Далее инкубируют реакционную смесь при нормальных условиях (температура окружающего воздуха  $20 \pm 10^\circ C$ , относительная влажность воздуха от 40 до 60%, атмосферное давление  $760 \pm 20$  мм рт.ст.) в течение 24 часов для установления полного адсорбционного равновесия. Полученный бионаноконъюгат отделяют из раствора методом магнитной сепарации на магнитном штативе (Promega), центрифугируют в течение 15 минут при 13400 об/мин и дважды промывают бидистиллированной водой и трис-содержащим буфером.

На рисунке 1 представлены ИК-спектры наночастиц феррита кобальта ( $Co_{0.9}Fe_{1.1}O_4$ ) после выдерживания в фосфатсодержащем буфере, олигонуклеотида ( $dG_{18}T_{25}$ ) и бионаноконъюгата ( $dG_{18}T_{25}-Co_{0.9}Fe_{1.1}O_4$ ), полученного согласно примеру 1.

ИК спектр получали в  $D_2O$  и  $H_2O$  методом НПВО на алмазном кристалле (Nicolet 6700 Thermo). Присутствие в ИК-спектре бионаноконъюгата характеристических полос поглощения: феррита кобальта при  $588 \text{ см}^{-1}$ , обусловленную колебаниями связи металл-кислород в тетраэдрических кислородных междоузлиях феррита, а также олигонуклеотида при  $1083 \text{ см}^{-1}$  и  $1210 \text{ см}^{-1}$ , обусловленную колебаниями симметричного и асимметричного фосфата, и в области  $1500-1700 \text{ см}^{-1}$ , обусловленных колебаниями групп оснований, подтверждает формирование бионаноконъюгата. Наблюдаемые изменения положения полос поглощения на ИК-спектре бионаноконъюгатов по сравнению с несвязанным олигонуклеотидом (таблица 1) является следствием взаимодействия групп сахарофосфатного остова и оснований гуанина с заряженными атомами на поверхности наночастицы.

На рисунке 2 показана эффективность связывания олигонуклеотида  $dG_{18}T_{25}$  с наночастицами различного состава. Видно, что наночастицы с содержанием кобальта в пределах 0.69-0.90 эффективно связывают олигонуклеотид из раствора ( $B_{max}=2.7 \pm 0.2$ ,  $K_d=0.36 \pm 0.07 \cdot 10^{-6}$  М) и формируют нанобиоконъюгат.

Удельная намагниченность ансамбля бионаноконъюгатов (МАГНИТОМЕТР Н-04) составляет  $20 \pm 0.4 \text{ Гс} \cdot \text{см}^3/\text{г}$ . Небольшое снижение магнитных свойств по сравнению с исходным ансамблем наночастиц феррита кобальта ( $22 \text{ Гс} \cdot \text{см}^3/\text{г}$ ) является следствием снижения межчастичного взаимодействия в ансамбле наночастиц из-за увеличения расстояния между ними.

Пример 2. Получение бионаноконъюгата для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго(dA) последовательность на 3'-конце.

Бионаноконъюгат, полученный согласно примеру 1, после отмывок водой промывают буфером 0.5 М NaCl, 10 мМ трис (7.5-8.0) и растворяют в этом же буфере до концентрации 5 мг/мл. В пробирке типа эппендорф смешивают 20 мкл суспензии, содержащей бионаноконъюгат, 60 мкл буфера 0.5 М NaCl, 10 мМ трис (7.5-8.0), 10 мкл 10x фосфатно-солевого буфера (PBS) (10xPBS: 1.37 М NaCl, 0.027 М KCl, 0.1 М  $Na_2HPO_4$ , 0.02 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) и 10 мкл водного раствора олигонуклеотида  $dA_{25}$  25 (5'-aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3'). Перемешивают смесь на вортексе (BioSan FV-2400). Выдерживают 10 минут при нормальных условиях и снова встряхивают на вортексе. Осаждают на магнитном штативе (Promega) в течение 10 минут. Супернатант удаляют. Дважды промывают осадок буфером 0.8 М NaCl, 10 мМ трис (7.5-8.0). Добавляют 20 мкл воды.

На рисунке 3 показана эффективность связывания (А, нмоль/мг) синтетического олигонуклеотида, содержащего 25 остатков аденина ( $dA_{25}$ ) из раствора 537 мМ NaCl, 8 мМ Трис, 2.7 мМ KCl, 10 мМ  $Na_2HPO_4$ , 2 мМ  $KH_2PO_4$  (pH 7.5), при варьировании концентрации  $dA_{25}$  от 0.25 до 5 мкмоль/л с использованием бионаноконъюгата. Эффективность последующей элюции в воде при прогревании до  $70^\circ C$  составила  $96,0 \pm 0,8\%$ .

На рисунке 4 показана эффективность связывания (А, нмоль/мг) синтетического олигонуклеотида, содержащего олиго(dA) последовательность на 3'-конце  $dN_{23}dA_{25}$  (5'-tctggtaaagtggatattgtgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3') с использованием бионаноконъюгатов, полученных на основе наночастиц различного состава.

Пример 3. Выделение полиА<sup>+</sup> мРНК с использованием нанобиоконъюгата.

После отмывок водой бионаноконъюгат промывают буфером 0,5 М NaCl, 10 мМ трис (7.5-8.0) и растворяют в этом же буфере до концентрации 5 мг/мл. В пробирке типа эппендорф смешивают 10 мкл суспензии, содержащей бионаноконъюгат, 70 мкл буфера 0,5 М NaCl, 10 мМ трис (7.5-8.0), 10 мкл 10x фосфатно-солевого буфера (PBS) (10xPBS: 1,37 М NaCl, 0,027 М KCl, 0,1 М  $Na_2HPO_4$ , 0,02 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) и 10 мкл



участку молекулы-«адаптера» олигонуклеотида  $Cy3-dN_{23}$  достигает 99%, тогда как некомплементарный олигонуклеотид  $Cy5-dN_{19}$  не связывается с биоконъюгатом при данных условиях.

На рисунке 7 приведены результаты электрофоретического анализа в 1,2% агарозном геле водных растворов олигонуклеотидов, выделенных с использованием бионаноконъюгата (элюция) (дорожки 1-3), супернатантов после инкубации смеси олигонуклеотидов с бионаноконъюгатом (дорожки 4-6), исходных проб (дорожки 7-9) содержащих смесь комплементарного и некомплементарного олигонуклеотидов (контроль) в концентрации от 0.5 до  $0.7 \cdot 10^{-6}$  М. Можно наблюдать, что  $Cy5$ -меченый олигонуклеотид, некомплементарный варибельной части олигонуклеотида-«адаптера», остается в супернатанте, тогда как комплементарный  $Cy3$ -меченый олигонуклеотид связывается с биоконъюгатом и может быть в последующем отделен от биоконъюгата (элюирован) водой.

Пример 5. Получение бионаноконъюгата для обнаружения и выделения специфической нуклеиновой кислоты (олигонуклеотида заданного состава).

Бионаноконъюгат, полученный согласно примеру 1, промывают в буфере (10 мМ трис, 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М  $Na_2HPO_4$ , 0,002 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) и растворяют в этом же буфере до концентрации 5 мг/мл. В пробирке типа эппендорф смешивают 50 мкл суспензии содержащей бионаноконъюгат, 50 мкл олигонуклеотида-«адаптера»  $dN_{21}dA_{25}$  в концентрации  $25 \cdot 10^{-6}$  М (5'-aaagcttatcagactgatgttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3') и доводят объем буфером (10 мМ трис, 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М  $Na_2HPO_4$ , 0,002 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) до 500 мкл. Перемешивают смесь на вортексе (BioSan FV-2400). Выдерживают 15 минут при нормальных условиях и снова встряхивают на вортексе. Осаждают биоконъюгат магнитной сепарацией и центрифугированием. Супернатант удаляют. Дважды промывают осадок буфером (10 мМ трис, 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М  $Na_2HPO_4$ , 0,002 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4). Растворяют в этом же буфере в конечном объеме 50 мкл.

10 мкл полученного бионаноконъюгата, гибридного с молекулой олигонуклеотида «адаптера»  $dN_{21}dA_{25}$  (5'-aaagcttatcagactgatgttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3'), смешивают в пробирке типа эппендорф с 90 мкл смеси, содержащей выбранный  $Cy3-dN_{21}$  (5'-caacatcagctctgataagct-/Cy3/-3'),  $Cy3-dN_{23}$  (5'-tctggtaaagtggatattgt-/Cy3/-3') олигонуклеотид в концентрации от 0.1 до  $0.8 \cdot 10^{-6}$  М, меченный флуоресцеиновой меткой (Cy3). Смесь инкубируют при 37°C 20 минут. Осаждают бионаноконъюгат магнитной сепарацией и центрифугированием. Надосадок отбирают, осадок промывают дважды буфером: 10 мМ трис, 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М  $Na_2HPO_4$ , 0,002 М  $KH_2PO_4$ , pH 7.4. Осадок ресуспендируют в воде и прогревают 15 минут при 70°C для элюции олигонуклеотида от бионаноконъюгата.

На рисунке 8 представлены результаты электрофоретического разделения проб, полученных в результате элюции, и супернатантов, полученных после выдерживания биоконъюгата с некомплементарным (дорожка 1 и 1s) и комплементарным (в концентрации от 0,1 до  $0.7 \cdot 10^{-6}$  М) варибельному участку молекулы-«адаптера» олигонуклеотидами (дорожки 2-8 и 2s-8s). Можно видеть, что при инкубации с некомплементарным олигонуклеотидом он не связывается с биоконъюгатом (дорожка 1) и остается в супернатанте (дорожка 1s), тогда как комплементарный варибельному участку молекулы-«адаптера» олигонуклеотид эффективно связывается из раствора (дорожки 2s-8s) и может быть элюирован в последующем от биоконъюгата (дорожки 2-8). Эффективность последующей элюции в воде при прогревании до 70°C составила  $96.0 \pm 0.8\%$ .

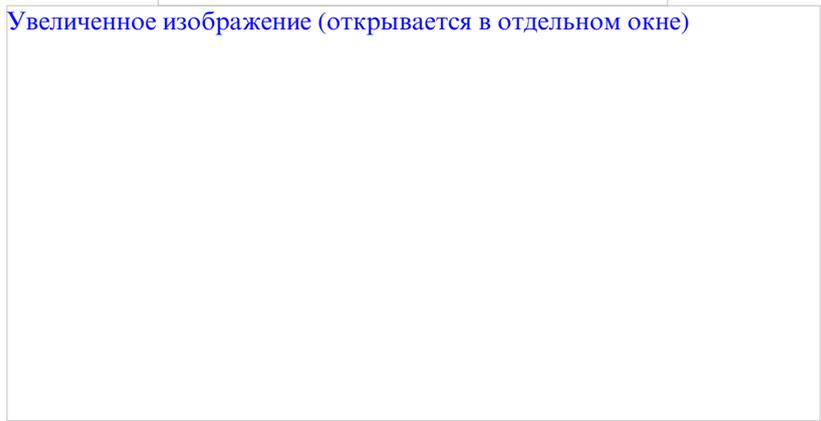
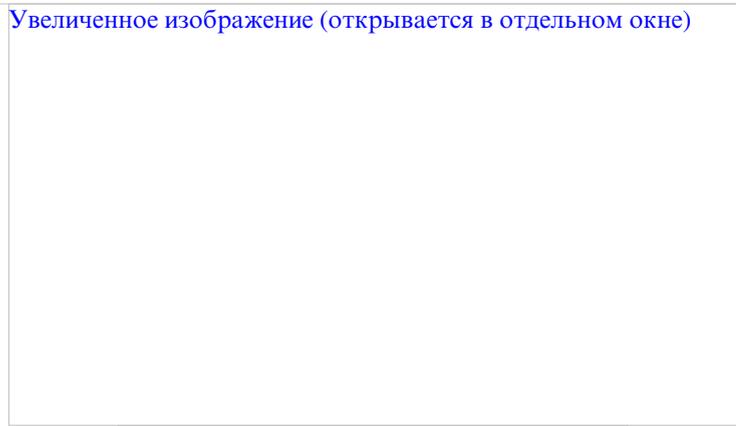
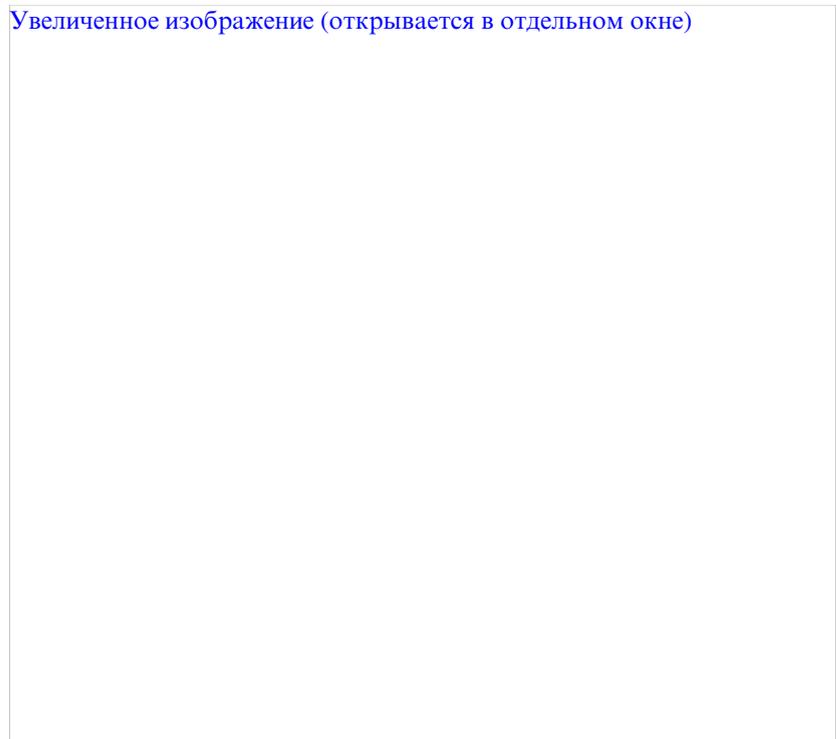
[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

#### Формула изобретения

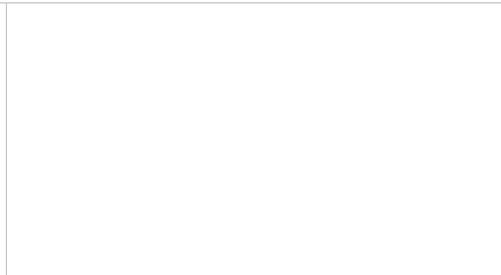
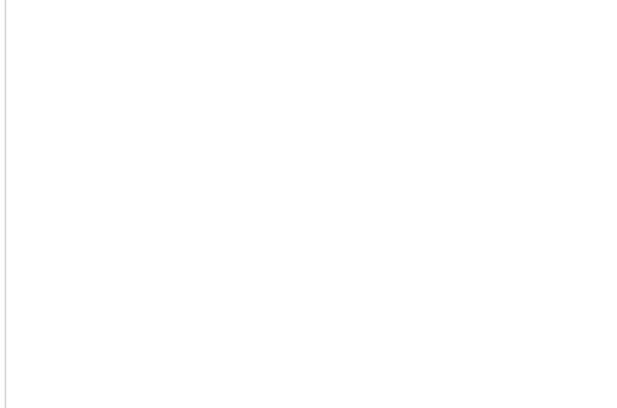
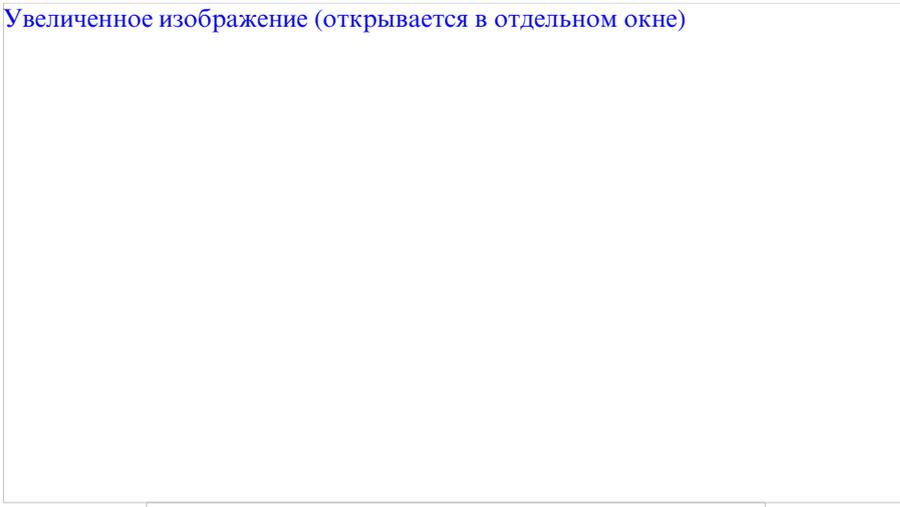
1. Бионаноконъюгат для выделения одноцепочечной нуклеиновой кислоты, представляющей собой специфическую гетеронуклеотидную нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту, содержащую олиго- или поли-A/dA последовательность, включающий наноразмерную суперпарамагнитную частицу кобальтовой феррошпинели  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , где  $0.6 \leq x \leq 0.98$ , полученную механохимическим синтезом, при этом для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго- или поли-A/dA последовательность, используют синтетический одноцепочечный олигонуклеотид  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , один участок которого, состоящий из гуаниновых нуклеотидов, в присутствии фосфат-анионов в растворе специфически связан с поверхностью наночастицы, а другой - состоящий из тиминных нуклеотидов, способен вступать в гибридизацию с олиго- или поли-A/dA нуклеотидными последовательностями, а для выделения из раствора в присутствии фосфат-анионов специфической гетеронуклеотидной последовательности дополнительно используют молекулу олигонуклеотида-адаптера, содержащую последовательность олиго-dA<sub>x</sub> на 3'-конце, гибридизованную с тиминными нуклеотидами комплекса комплекса  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и участок на 5'-конце, комплементарный специфической гетеронуклеотидной последовательности в растворе.

2. Способ получения бионаноконъюгата для выделения одноцепочечных нуклеиновых кислот по п. 1, заключающийся в том, что для выделения нуклеиновой кислоты, содержащей олиго- или поли-A/dA последовательность, берут наночастицы суперпарамагнитной кобальтовой феррошпинели  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , где  $0.6 \leq x \leq 0.98$ , полученные механохимическим синтезом, наночастицы промывают дистиллированной водой, готовят водную суспензию отмытых наночастиц, суспензию разделяют на фракции в виде осадка и надосадка, отбирают надосадок и смешивают с ним синтетический одноцепочечный олигонуклеотид  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и фосфат натрия в концентрации  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л, после чего смесь инкубируют до установления полного адсорбционного равновесия и выделяют бионаноконъюгат методом магнитной сепарации с последующим центрифугированием и промыванием, а для выделения гетеронуклеотидной последовательности в раствор, содержащий наночастицы кобальтовой феррошпинели, связанные с синтетическим одноцепочечным олигонуклеотидом  $5'-dG_n dT_m$ , где  $n=5-30$ ,  $m=10-35$ , и фосфат натрия в концентрации  $(10 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$  моль/л, добавляют молекулы олигонуклеотида-адаптера, содержащие последовательность олиго-dA<sub>x</sub> на 3'-конце и участок на 5'-конце, комплементарный специфической гетеронуклеотидной последовательности в растворе, после чего смесь вновь инкубируют до установления полного адсорбционного равновесия и выделяют бионаноконъюгат методом магнитной сепарации с последующим центрифугированием и промыванием.

3. Способ по п. 2, заключающийся в том, что  $n$  предпочтительно равно = 10-25, а  $m$  предпочтительно равно 15-25.



Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне)



Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне)

