

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТІВ АПАТИТОВОГО ТИПУ ДЛЯ СОРБЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Горюнов Я.А., Прохоренко Д.К.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, goryunow29012004@gmail.com

Abstract

Hydroxyapatite is a promising material for nucleic acid extraction due to its phosphate affinity and biocompatibility. Modifications to HAp improve binding selectivity and protect biomolecules from degradation. Such optimized sorbents open new possibilities for applications in rapid molecular diagnostics without complex sample preparation and environmental DNA monitoring.

Keywords: *nano-hydroxyapatite, nucleic acid extraction, hydroxyapatite sorbents, biotechnology.*

Вступ. Екстракція нуклеїнових кислот є важливим етапом у молекулярно-біологічних дослідженнях, клінічній діагностиці та біотехнології. Одним із перспективних матеріалів для селективного виділення нуклеїнових кислот є нанорозмірні кальцій фосфати апатитового типу або наногідроксиapatити (нано-ГАп), які завдяки високій спорідненості до фосфатвмісних молекул, забезпечують ефективне виділення генетичного матеріалу навіть із біологічних середовищ з високим вмістом домішок [1–3].

Застосування наногідроксиapatиту для сорбції нуклеїнових кислот відкриває нові можливості для виділення нуклеїнових кислот для клінічної діагностики, створення надійних систем зберігання генетичного матеріалу без використання заморожування, що є надзвичайно актуальним для біобанкінгу [4, 5]. Крім того, нано-ГАп перспективно використовується для екологічного моніторингу, зокрема для збору ДНК із природних середовищ за допомогою 3D-надрукованих носіїв [6], що дозволяє проводити довготривалі спостереження за станом біорізноманіття без активного втручання.

Завдяки своїм властивостям нано-ГАп є перспективними для сорбції нуклеїнових кислот, проте на сьогодні мало досліджень цих сполук у даному напрямку порівняно з їх використанням у медицині, тому все більш актуальним є пошук підходів для екстракції нуклеїнових кислот з використанням нанорозмірних ГАп.

Метою роботи була оцінка перспектив використання кальцій фосфатів апатитового типу для сорбції нуклеїнових кислот

Матеріали та методи. Дослідження проводили шляхом аналізу наукової літератури з використанням міжнародних систем цитування (NCBI, PubMed, OUCI та ін.).

Результати та обговорення. ДНК-орієнтовані методи генетичного аналізу та ідентифікації біологічних об'єктів відіграють важливу роль у молекулярно-генетичних дослідженнях. Хоча хроматографічні та рідинні методи очистки нуклеїнових кислот здатні до масштабування та мають високу роздільну здатність, вони є відносно трудомісткими та вимагають використання шкідливих органічних розчинників з утворенням токсичних відходів. Тому існує потреба в швидких та надійних методах підготовки проб нуклеїнових кислот, які можуть зберегти їх якість для використання в ферментативному розщепленні,

полімеразній ланцюговій реакції та методах секвенування. Наногідроксиапатити є перспективними матеріалами для використання в медицині та біотехнології завдяки своїй біосумісності, високій питомій поверхні та хімічній спорідненості до фосфатвмісних молекул. Завдяки здатності формувати міцні зв'язки з фосфатними групами, нано-ГАп відкриває нові можливості для ефективної, швидкої та селективної екстракції ДНК та РНК з різноманітних біологічних середовищ.

Перші результати щодо екстрагування ДНК й рРНК з осадів морського середовища за допомогою гідроксиапатитних спін-колонок були отримані у 1996 році [1]. Цей підхід виявився особливо ефективним у середовищах із високим вмістом домішок, та забезпечив прискорену підготовку проб для молекулярного аналізу без потреби у тривалому очищенні.

Подальші дослідження підтвердили ефективність гідроксиапатиту як сорбенту для селективного розділення нуклеїнових кислот. Andrews-Pfannkoch та спів. застосували ГАп для поділу дво- та одноланцюгової нуклеїнових кислот із вірусних зразків, відзначивши спорідненість фосфатних груп до кальцію [2]. Williamson та колеги продемонстрували ефективність хроматографії з використанням ГАп для розділення форм ДНК [3]. Del Valle вказав на ключову роль електростатичних і водневих зв'язків у механізмі сорбції нуклеїнових кислот на гідроксиапатитах [4], а Napierala довів, що ДНК може стабільно зберігатися на кристалах як ГАп, так і нано-ГАп у природних умовах [5].

Нано-ГАп завдяки високій питомій поверхні, активним функціональним групам та можливості модифікацій є більш перспективним матеріалом для екстракції органічних речовин порівняно з ГАп. Модифікації, такі як інтеграція магнітних наночастинок, зміна співвідношення Са/Р чи введення функціональних груп, дозволяють покращити ефективність сорбції та забезпечити захист ДНК від деградації [6–8]. Особливо перспективними є гідроксиапатити з магнітними частинками або феритами, де сорбція ДНК здійснюється за рахунок електростатичної взаємодії фосфатних груп із кальцієм на поверхні сорбенту, що забезпечує високу ефективність навіть у багатокомпонентних середовищах [8].

Модифіковані магнітними компонентами нано-ГАп продемонстрували суперпарамагнітні властивості, які ідеально підходять для автоматизованих систем виділення нуклеїнових кислот [9]. Показано, що зв'язування нуклеїнових кислот із магнітовмісними нано-ГАп відбувається за рахунок електростатичної взаємодії: негативно заряджені фосфатні групи ДНК взаємодіють із позитивно зарядженими кальцієвими іонами на поверхні сорбенту. Було встановлено, що на ефективність зв'язування також впливає середовище сорбції. У водному розчині сорбція становила близько 0,42 мкг ДНК на 1 мг магнітних нано-ГАп. Проте в слабкому сольовому середовищі, наприклад, у 10 мМ розчині ацетату натрію, ефективність значно зростала – до 3,96 мкг/мг [8]. Практичну реалізацію нано-ГАп у методах виділення ДНК продемонстровано у роботі Shan та спів. [10], де було розроблено простий і швидкий протокол очищення плазмідної ДНК з клітин *E. coli* за допомогою магнітовмісних нано-ГАп у присутності копреципітаторів

PEG/NaCl. PEG-індукована конденсація ДНК виявилась критичним фактором для її ефективного зв'язування з магнітними нано-ГАп, а отриманий продукт був придатний для рестрикційного аналізу та ПЛР, що доводить практичне використання даних методів у медичній та біотехнологічній галузі як альтернативу сорбентам на оксидах кремнію та методам рідинно-рідинної екстракції.

Висновки. Отже, використання кальцій фосфатів апатитового типу для екстракції нуклеїнових кислот є перспективним з точки зору їх ефективності, селективності та стабільності при виділенні нуклеїнових кислот та інтеграції даних підходів в біотехнологію. Завдяки здатності зв'язувати фосфатні групи, нано-ГАп забезпечують якісне виділення ДНК та РНК навіть із багатокомпонентних середовищ. Модифікації нано-ГАп, такі як інтеграція магнітних наночастинок, дозволяють підвищити ефективність сорбції нуклеїнових кислот та автоматизувати дані процеси.

Список використаної літератури:

1. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. / K. J. Purdy et al. *Applied and environmental microbiology*. 1996. Vol. 62, no. 10. P. 3905–3907. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3905-3907.1996>.
2. Hydroxyapatite-mediated separation of double-stranded dna, single-stranded DNA, and RNA genomes from natural viral assemblages / C. Andrews-Pfannkoch et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76, no. 15. P. 5039–5045. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.00204-10>.
3. Fadrosch D. W., Andrews-Pfannkoch C., Williamson S. J. Separation of single-stranded dna, double-stranded DNA and RNA from an environmental viral community using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Visualized Experiments*. 2011. No. 55. URL: <https://doi.org/10.3791/3146>.
4. DNA adsorbed on hydroxyapatite surfaces / L. J. del Valle et al. *J. Mater. Chem. B*. 2014. Vol. 2, no. 40. P. 6953–6966. URL: <https://doi.org/10.1039/c4tb01184h>.
5. DNA Binding to Hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA / M. Brundin et al. *Journal of Endodontics*. 2013. Vol. 39, no. 2. P. 211–216. URL: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.013>.
6. Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers / H. Verdier et al. *Molecular Ecology Resources*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13604>.
7. Applications of nano hydroxyapatite as adsorbents: A review / I. L. Balasooriya. *Nanomaterials*. Basel, Switzerland. Vol. 12, no. 2324. URL: <https://doi.org/10.3390/nano12142324>.
8. Magnetic hydroxyapatite: a promising multifunctional platform for nanomedicine application / S. Mondal et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2017. Vol. 12. P. 8389–8410. URL: <https://doi.org/10.2147/ijn.s147355>.
9. Biedrzycka A., Skwarek E., Hanna U. M. Hydroxyapatite with magnetic core: Synthesis methods, properties, adsorption and medical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2021. Vol. 291. P. 102401. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102401>.
10. Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA / Z. Shan et al. *Analytical Biochemistry*. 2012. Vol. 425, no. 2. P. 125–127. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.013>.