

УДК 541.64

## **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ДНК СЕНСОРОВ ПРИ НАЛИЧИИ ЗАРЯЖЕННЫХ ЛИГАНДОВ**

Ш.А. ТОНОЯН<sup>1</sup>, А.А. АКОПЯН<sup>2</sup>, А.К. АНДРЕАСЯН<sup>1</sup>,  
В.Ф. МОРОЗОВ<sup>1</sup>, Е.Ш. МАМАСАХЛИСОВ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

<sup>2</sup>Институт радиофизики и электроники НАН Армении, Аштарак, Армения

\*e-mail: y.mamasakhlisov@ysu.am

(Поступила в редакцию 4 декабря 2017 г.)

Проанализированы факторы, влияющие как на термодинамику гибридизации, так и на стабильность дуплексов ДНК–ДНК. Исследованы случаи неконкурентной гибридизации ДНК при наличии в растворе моно- и бивалентных положительно заряженных лигандов и проведено сопоставление со случаем незаряженных лигандов. Показано, что заряженные лиганды усиливают чувствительность ДНК-чипов в сравнении с незаряженными.

### **1. Введение**

ДНК-чипы являются одним из перспективных инструментов с большим разнообразием областей применения, таких как медицинская диагностика, мониторинг загрязнителей окружающей среды, защиты от биологического оружия и т. д. [1, 2]. Одним из важных направлений разработки ДНК-чипов является повышение их чувствительности за счет усиления электрического сигнала и стабильности целевого зонда гибридизации. Эффективность таких устройств, как ДНК-датчики и ДНК-чипы зависит от точности предсказания экспериментальных параметров, отвечающих за термостабильность дуплексов нуклеиновых кислот и время формирования дуплексов ДНК [3]. Некоторые факторы влияют на термодинамику гибридизации, в частности, на поверхностную плотность одноцепочечных ДНК (длина 25–49 нуклеотидов), иммобилизованных на поверхности, и наличие конкурирующей гибридизации. Стабильность дуплексов ДНК–ДНК и ДНК–РНК определяется двумя ключевыми факторами: последовательностью и внешними факторами (рН, ионная сила, концентрация низкомолекулярных соединений (лигандов), наличие межфазных границ, геометрических ограничений и т. д.). Лучшее понимание физико-химических процессов, лежащих в основе

гибридизации ДНК и РНК на поверхности электрического преобразователя имеет важное значение для улучшения эффективности ДНК-чипов и их изготовления [4].

Одним из основных требований, предъявляемых к ДНК-сенсорам, является высокая чувствительность, которая, в свою очередь, требует максимальной эффективности гибридизации на границе раздела твердой и жидкой фаз. Гибридизация нуклеиновых кислот в значительной степени зависит от температуры, концентрации солей, вязкости, GC-состава и других физико-химических характеристик. Повышение чувствительности ДНК-датчиков может быть достигнуто с помощью электрохимически активных соединений с более высоким сродством к двухцепочечной ДНК, чем к одноцепочечной. Этот вид соединений может существенно повысить стабильность двухцепочечных участков и в то же время амплитуду генерируемого сигнала, что, в свою очередь, повысит чувствительность ДНК-датчика. Такими лигандами являются, например, интеркаляторы – молекулы с плоской гетероциклической структурой, которые помещаются между азотистыми основаниями и меняют локальную структуру двухцепочечной ДНК [5–7].

Термодинамика и кинетика гибридизации как в объеме [8, 9], так и на поверхности [4, 10–16] была тщательно изучена в последние годы. Спектр рассматриваемых проблем включает в себя кинетику гибридизации на поверхности [12, 14], влияние солей на гибридизацию ДНК в объеме [9], изотермы гибридизации на поверхности [4] и т. д. В то же время взаимодействия ДНК–лиганд также были рассмотрены в большом количестве работ, посвященных интеркаляции [5–7] и связыванию лигандов в малой бороздке [17, 18], их кросс-докингу [19] и т. д. Однако, насколько нам известно, влияние взаимодействия ДНК–лиганд на термодинамику и кинетику гибридизации никогда не было рассмотрено ранее. В контексте развития ДНК-биосенсоров, теоретический анализ влияния интеркаляции лигандов на гибридизацию ДНК на поверхности становится необходимым.

Настоящая работа посвящена изучению изотермы гибридизации ДНК на поверхности при наличии положительно заряженных лигандов, которые связываются с нативными участками ДНК. Хотя при практическом использовании ДНК-чипы погружаются в целевой раствор на относительно короткий промежуток, где кинетика гибридизации играет важную роль. Понимание равновесных свойств также необходимо для сравнительной оценки важности кинетических и термодинамических факторов для производительности ДНК-чипов.

## 2. Неконкурентная гибридизация при наличии лигандов

### 2.1. Свободная энергия

Рассмотрим равновесную изотерму гибридизации для идеализированной, но экспериментально доступной ситуации, когда ДНК-чип погружен в раствор, содержащий интеркалированные лиганды, и имеем только один тип одноцепочечной мишени (рис.1).

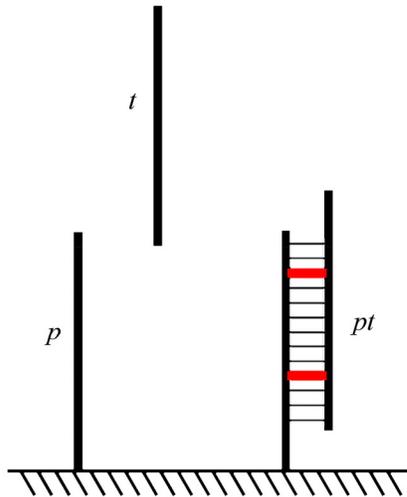


Рис.1. Схема неконкурентной гибридизации на поверхности при наличии лигандов.

Рассмотрим совокупность  $N_0$  однопитевых пробных молекул ДНК  $p$ , где  $N_{pt}$  из них гибридизованы с мишенью  $t$ . Гибридизация  $p$  и  $t$  создает на поверхности двухцепочечный олигонуклеотид  $pt$ . В простейшем случае для одного вида мишени, состоящей из одноцепочечной ДНК, поверхность будет покрыта только свободными зондами  $p$  и гибридизованными олигонуклеотидами  $pt$ . В этом случае мы имеем одну реакцию



Реакции конкурентной гибридизации отсутствуют (рис.1). Зависимость степени гибридизации  $x = N_{pt} / N_0$  от концентрации мишеней  $c_t$  описывается с помощью изотермы гибридизации. Для интеркалирующих лигандов  $l$  реакции связывания будут иметь следующий вид:



где  $pt$  является свободным дуплексом, а  $pt_j$  является дуплексом мишень–зонд, связанным с лигандом  $l$ .

В отсутствие лигандов свободная энергия слоя с зондами будет иметь следующий вид [11]:

$$G = G_0 + N_{pt}\mu_{pt}^0 + (N_0 - N_{pt})\mu_p^0 + N_0\Sigma\gamma_{el} + k_B T \left[ N_{pt} \ln \left( \frac{N_{pt}}{N_0} \right) + (N_0 - N_{pt}) \ln \left( \frac{N_0 - N_{pt}}{N_0} \right) \right], \quad (3)$$

где  $\Sigma$  является площадью, приходящуюся на один зонд,  $G_0$  – плотность свободной энергии голой поверхности,  $\mu_{pt}^0$  и  $\mu_p^0$  – химические потенциалы зондов  $pt$  и  $p$  в исходном состоянии, а  $\gamma_{el}$  – электростатическая плотность свободной энергии зондирующего слоя.

Если интеркаляция является единственным механизмом связывания лигандов, то образование комплекса ДНК–лиганд будет ограничено только двуцепочечными областями и свободная энергия слоя с зондами составляет

$$G_L = G + N_{pt} \left\{ m\mu_b^0 + k_B T \left[ m \ln \left( \frac{m}{N} \right) + (N - m) \ln \left( \frac{N - m}{N} \right) \right] \right\}, \quad (4)$$

где  $m$  – число связанных лигандов из расчета на одну гибридизованную пробу  $pt$ , а  $\mu_b^0$  – химический потенциал связанного лиганда в исходном состоянии. Предполагается, что доступное количество мест связывания на дуплексе  $pt$  совпадает с длиной  $N$ . Таким образом, свободная энергия слоя с зондами запишется в виде функции от независимых величин: числа гибридизованных зондов  $N_{pt}$  и числа связанных лигандов  $N_b = mN_{pt}$ . Свободная энергия имеет вид

$$G_L(N_{pt}, N_b) = G(N_{pt}) + N_b\mu_b^0 + k_B T \left[ N_b \ln \left( \frac{N_b}{NN_{pt}} \right) + (NN_{pt} - N_b) \ln \left( \frac{NN_{pt} - N_b}{NN_{pt}} \right) \right]. \quad (5)$$

## 2.2. Изотермы адсорбции и гибридизации

Состояние равновесия для реакций (1) и (2) будет определяться с помощью условий

$$\mu_{pt} = \mu_p + \mu_l, \quad (6)$$

$$\mu_b = \mu_l, \quad (7)$$

где величина  $\mu_{pt}$  является химическим потенциалом гибридизованного зонда  $pt$ ,  $\mu_l$  и  $\mu_p$  – химические потенциалы мишени и зонда, а  $\mu_b$  и  $\mu_l$  – химические потенциалы связанных и несвязанных лигандов, соответственно [20].

Плотность электростатической свободной энергии слоя с зондами  $\gamma_{el}$  была оценена в работе [11] в приближении двухкомпонентного ящика [21–24]. В этом приближении ступенчатый профиль распределения мономеров позволяет рассматривать полиэлектролиты на поверхности как непрерывную область с равномерным распределением заряда. При высоком содержании солей экранирование в заряженном слое приводит к следующему выражению для плотности электростатической свободной энергии:

$$\frac{\gamma_{el}}{k_B T} = 4\pi\sigma^2 l_B \frac{r_D^2}{H}, \quad (8)$$

где величина  $l_B = e^2/(\epsilon k_B T)$  – длина Бюоррума,  $\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость,  $r_D$  – дебаевская длина экранирования и  $\sigma$  – поверхностная плотность заряда. Здесь  $H$  – толщина слоя с зондами, и предполагается, что заряды распределяются в этом слое равномерно. Так как каждая цепь содержит заряд  $-eN$ , поверхностная плотность заряда  $\sigma$  зависит от степени гибридизации  $x$  как

$$\sigma = \frac{NN_0 + NN_{pt} - zN_b}{A}, \quad (9)$$

где  $A$  – площадь поверхности сенсора и  $z$  – валентность положительно заряженного лиганда.

С учетом зависимости поверхностной плотности электростатической свободной энергии (8) от числа гибридизованных проб  $N_{pt}$  и общего числа связанных лигандов  $N_b$  обменный химический потенциал гибридизованного зонда ( $\Delta\mu_{pt} = \mu_p - \mu_t$ ) запишется в виде

$$\Delta\mu_{pt} = \frac{\partial G_L}{\partial N_{pt}} = \Delta\mu_{pt}^0 + N_0 \Sigma \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial N_{pt}} + k_B T \ln \frac{x}{1-x} + k_B T \ln(1-r), \quad (10)$$

где  $r = N_b/(NN_{pt})$  описывает степень адсорбции лигандов  $l$  в двухцепочечной ДНК. Плотность электростатической свободной энергии  $\gamma_{el}$  рассматривается как функция от плотности зарядов на поверхности  $\sigma$ . В то же время химический потенциал связанных лигандов составляет [20]

$$\mu_b = \frac{\partial G_L}{\partial N_b} = \mu_b^0 + N_0 \Sigma \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial N_b} + k_B T \ln \frac{r}{1-r}. \quad (11)$$

В приближении слабого раствора химический потенциал мишени имеет вид

$$\mu_t = \mu_t^0 + k_B T \ln c_t, \quad (12)$$

а химический потенциал свободных лигандов в растворе

$$\mu_l = \mu_l^0 + k_B T \ln c_l, \quad (13)$$

где величины  $c_t$  и  $c_l$  являются объемными концентрациями мишеней и лигандов, соответственно.

Учитывая уравнения (6)–(13), получим изотерму гибридизации

$$\frac{x(1-r)^N}{c_t(1-x)} = K_t \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{cl}}{\partial N_{pl}}\right), \quad (14)$$

где  $K_t = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{k_B T}\right)$  и  $\Delta G^0 = \mu_{pl}^0 - \mu_p^0 - \mu_l^0$ . Равновесное распределение  $l$  между связанными и свободными состояниями будет описываться изотермой адсорбции

$$\frac{r}{c_l(1-r)} = K_l \exp\left(-\frac{N_0 \Sigma}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{cl}}{\partial N_b}\right), \quad (15)$$

где  $K_l = \exp\left(-\frac{\Delta g^0}{k_B T}\right)$  и  $\Delta g^0 = \mu_b^0 - \mu_l^0$ . Система уравнений (14) и (15) преобразуется как

$$\begin{aligned} \frac{x(1-r)^N}{1-x} &= c_t K_t \exp[-\Gamma(1+x-zrx)], \\ \frac{r}{1-r} &= c_l K_l \exp\left[\frac{\Gamma}{N}(1+x-zrx)\right], \end{aligned} \quad (16)$$

где  $\Gamma = 8\pi N \sigma_0 l_B \frac{r_D^2}{H}$  и  $\sigma_0 = \frac{NN_0}{A}$ .

### 3. Результаты

#### 3.1. Изотермы адсорбции и гибридизации при наличии моновалентных лигандов

Численное решение системы уравнений (16) для моновалентных лигандов ( $z=1$ ) дает изотермы гибридизации и адсорбции, приведенные на рис.2. Изотермы гибридизации для незаряженных лигандов получены в работе [25], где было показано, что они имеют вид

$$\frac{x}{1-x} = c_t \tilde{K}_t e^{-\Gamma(1+x)}, \quad (17)$$

где  $\tilde{K}_t = K_t e^{-N \ln(1-r^*)}$  и  $r^* = c_l K_l / (c_l K_l + 1)$  – равновесная степень адсорбции. Изотерма гибридизации для незаряженных лигандов приведена на рис.2, откуда видно, что степень адсорбции заряженных лигандов слабо зависит от концентрации ДНК-мишеней в растворе. В то же время наличие заряда

заметно усиливает гибридизацию мишень–зонд на поверхности сенсора при малых концентрациях мишеней  $c_t$ . Эффект, возможно, обусловлен частичной нейтрализацией заряда поверхностного слоя.

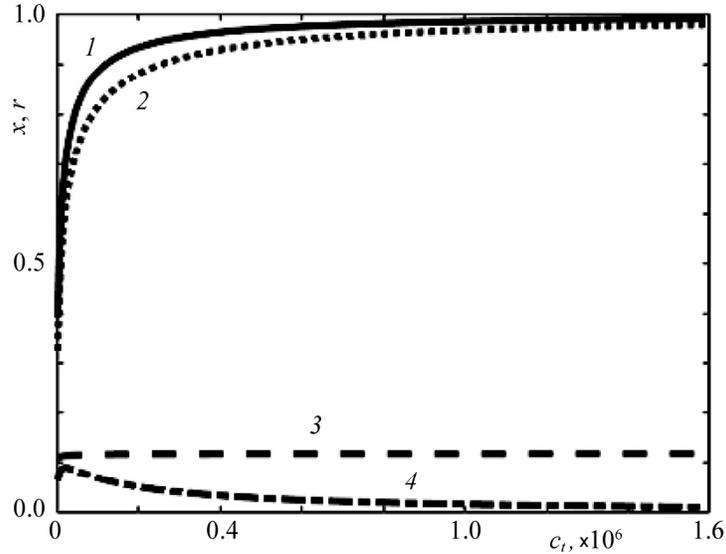


Рис.2. Изотермы гибридизации для моновалентного положительного заряженного лиганда (1), для незаряженных лигандов (2), для моновалентных лигандов (3) и сдвиг изотермы гибридизации от случая незаряженного лиганда к заряженному (4). Кривые получены для следующих значений параметров:  $l_B \approx 7 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 3 \text{ \AA}$ ,  $N = 16$ ,  $K_t = 10^9 \text{ M}^{-1}$  и  $\Gamma \approx 2.57$ .

### 3.2. Изотермы адсорбции и гибридизации при наличии бивалентных лигандов

Гибридизация зонд–мишень на поверхности ДНК-сенсора при наличии бивалентных лигандов описывается системой уравнений (14), соответствующей  $z = 2$ . Степень заполнения определяется уравнением

$$r(1-r) = c_t K_l (c_t K_l)^{2/N} \left( \frac{1}{x} - 1 \right)^{2/N}. \quad (18)$$

Таким образом, решение для степени заполнения  $r = r(x)$  в зависимости от степени гибридизации имеет две ветви:  $r \geq 1/2$  и  $r \leq 1/2$ . Из уравнения (18) очевидным образом следует, что степень гибридизации удовлетворяет условию

$$\frac{(4c_t K_l)^{\frac{2}{N}} c_t K_l}{1 + (4c_t K_l)^{\frac{2}{N}} c_t K_l} \leq x \leq 1. \quad (19)$$

Таким образом, при наличии двухвалентных лигандов степень гибридизации не может быть ниже значения

$$x_{\min} = \frac{(4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l}{1 + (4c_l K_l)^{\frac{2}{N}} c_l K_l}.$$

При  $z = 2$  численное решение системы уравнений (14) дает изотермы гибридизации и адсорбции, представленные на рис.3. Ветви решений, соответствующие  $r \geq 1/2$  и  $r \leq 1/2$ , представлены кривыми 2 и 3, соответственно.

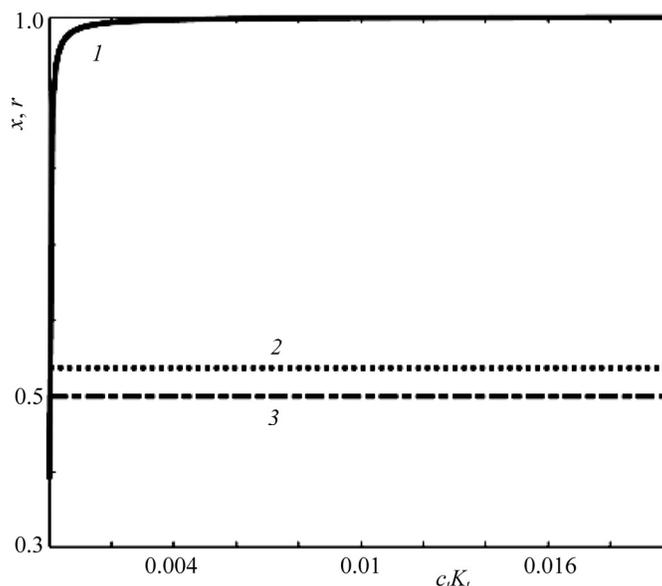


Рис.3. Изотерма гибридизации для бивалентного положительного заряженного лиганда (1) и изотермы адсорбции для решений  $r \geq 1/2$  (2) и  $r \leq 1/2$  (3). Кривые получены для следующих значений параметров:  $l_B \approx 7 \text{ \AA}$ ,  $r_D \approx 3 \text{ \AA}$ ,  $N = 16$ ,  $K_l = 10^9 \text{ M}^{-1}$  и  $\Gamma \approx 2.57$ .

Качественно эти решения не отличаются друг от друга и поведение изотермы гибридизации в обоих случаях практически одинаково. Однако в одном случае лиганды заполняют больше, а в другом меньше половины доступных центров связывания нативной ДНК. В зависимости от параметров системы либо одна, либо другая ветвь будут соответствовать метастабильному состоянию. Результаты, приведенные на рис.2 и 3, показывают, что наличие заряда у интеркалирующего лиганда усиливает гибридизацию на поверхности ДНК-сенсора по сравнению с таковой для незаряженного лиганда, вследствие чего повышается чувствительность ДНК-сенсора.

#### 4. Заключение

Исследованы термодинамические свойства поверхности ДНК-сенсора с привитыми к нему ДНК-зондами, взаимодействующими с ДНК-мишенями и лигандами в растворе. Проанализированы некоторые факторы, влияющие на термодинамику гибридизации ДНК на границе раздела твердое тело–раствор. Для случаев неконкурентной гибридизации ДНК на поверхности исследованы такие термодинамические характеристики системы, как изотермы гибридизации ДНК-мишеней с ДНК-зондами и изотермы адсорбции интеркалирующих лигандов на комплексы зонд–мишень. Проведенный анализ показывает, что связывание с заряженными интеркалирующими лигандами приводит к увеличению чувствительности ДНК-сенсоров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins.** *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 599 (1999).
2. **J. Labuda, A.M.O. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, I. Palchetti, E. Paleček, J. Wang.** *Pure Appl. Chem.*, **82**, 1161 (2010).
3. **J.H. Watterson, P.A.E. Piunno, U.J. Krull.** *Anal. Chem. Acta*, **457**, 29 (2002).
4. **A. Halperin, A. Buhot, E.B. Zhulina.** *J. Phys.: Condens. Matter.*, **18**, S463 (2006).
5. **G. Ananyan, A. Avetisyan, L. Aloyan, Y. Dalyan.** *Biophys. Chem.*, **156**, 96 (2011).
6. **A.A. Ghazaryan, Y.B. Dalyan, S.G. Haroutiunian, A. Tikhomirova, T.V. Chalikian.** *J. Amer. Chem. Soc.*, **128**, 1914 (2006).
7. **R.F. Pasternack, J.I. Goldsmith, S. Szep, E.J. Gibbs.** *Biophys. J.*, **75**, 1024 (1998).
8. **D.M. Hinckley, G.S. Freeman, J.K. Whitmer, J.J. de Pablo.** *J. Chem. Phys.*, **139**, 144903 (2013).
9. **D.M. Hinckley, J.P. Lequieu, J.J. de Pablo.** *J. Chem. Phys.*, **141**, 035102 (2014).
10. **A.W. Peterson, R.J. Heaton, R.M. Georgiadis.** *Nucl. Acids Res.*, **29**, 5163 (2001).
11. **A. Halperin, A. Buhot, E.B. Zhulina.** *Biophys. J.*, **86**, 718 (2004).
12. **M.F. Hagan, A.K. Chakraborty.** *J. Chem. Phys.*, **120**, 4958 (2004).
13. **M.M.A. Seckar, W. Bloch, P.M.S. John.** *Nucleic Acids Res.*, **33**, 366 (2005).
14. **N.V. Sorokin, V.R. Chechetkin, S.V. Pan'kov, O.G. Somova, M.A. Livshits, M.Y. Donnikov, A.Y. Turygin, V.E. Barsky, A.S. Zasedatelev.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **24**, 57 (2006).
15. **D. Irving, P. Gong, R. Levicky.** *J. Phys. Chem. B*, **114**, 7631 (2010).
16. **T.J. Schmitt T.A. Knotts IV.** *J. Chem. Phys.*, **134**, 205105 (2011).
17. **S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny.** *Mutation Research/Fund. Molec. Mechan. Mutagen.*, **623**, 24 (2007).
18. **V.V. Kostjukov, A.A.H. Santiago, F.R. Rodriguez, S.R. Castilla, J.A. Parkinson, M.P. Evstigneev.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 5588 (2012).
19. **C.G. Ricci, P.A. Netz.** *J. Chem. Inf. Model.*, **49**, 1925 (2009).
20. **C. Tanford.** *Proceed. Natl. Acad. USA*, **78**, 270 (1981).
21. **P. Pincus.** *Macromolecules*, **24**, 2912 (1991).
22. **J. Wittmer, J.F. Joanny.** *Macromolecules*, **26**, 2691 (1993).

23. **O.V. Borisov, E.B. Zhulina, T.M. Birshtein.** *Macromolecules*, **27**, 4795 (1994).
24. **I.Y. Wong, N.A. Melosh.** *Biophys. J.*, **98**, 2954 (2010).
25. **Y.Sh. Mamasakhlisov, A.P. Antonyan, A.A. Hakobyan.** *Proceed. YSU*, **51**, 66 (2017).

ԴՆԹ-Ի ՍԵՆՍՈՐՆԵՐԻ ԶԳԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼԻՑԲԱՎՈՐՎԱԾ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Շ.Ա. ՏՈՆՈՅԱՆ, Ա.Ա. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Ա.Կ. ԱՆԴՐԻԱՍՅԱՆ,  
Վ.Ֆ. ՄՈՐՈԶՈՎ, Ե.Շ. ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ

Վերլուծվել են այն գործոնները, որոնք ազդում են ինչպես հիբրիդիզացիայի ջերմադինամիկայի, այնպես էլ ԴՆԹ-ԴՆԹ դուպլեքսների կայունության վրա: Այս աշխատանքում ուսումնասիրված են ԴՆԹ-ի ոչ մրցակցային հիբրիդիզացիայի դեպքերը՝ լուծիչում միա- և երկվալենտ, դրականապես լիցքավորված լիգանդների առկայությամբ: Արդյունքները համադրվել են չլիցքավորված լիգանդների դեպքի հետ: Մասնավորապես, ցույց է տրվել, որ լիցքավորված լիգանդները մեծացնում են ԴՆԹ-սենսորների զգայունությունը՝ չլիցքավորվածների համամատությամբ:

#### SENSITIVITY OF DNA SENSORS IN THE PRESENCE OF CHARGED LIGANDS

Sh.A. TONOYAN, A.A. HAKOBYAN, A.K. ANDREASSIAN,  
V.F. MOROZOV, Y.Sh. MAMASAKHLISOV

Factors that influence both the thermodynamics of hybridization and the stability of DNA–DNA duplexes are analyzed. The noncompetitive DNA hybridization in the presence of mono- and bivalent positively charged ligands have been investigated. A comparison is made with the case of uncharged ligands. It has been shown that charged ligands enhance the sensitivity of DNA chips in comparison with uncharged ones.