Известия НАН Армении, Физика, т.55, №1, с.117–125 (2020)

УДК 541.64

ПРОВОДИМОСТЬ МОНОСЛОЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК – КВАНТОВАЯ ТОЧКА В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРКАЛИРУЮЩИХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЛИГАНДОВ

А.Е. МАМАСАХЛИСОВ¹, Э.М. КАЗАРЯН¹, Ш.А. ТОНОЯН², В.Ф. МОРОЗОВ², Е.Ш. МАМАСАХЛИСОВ^{2*}

¹Российско–Армянский университет, Ереван, Армения ²Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

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

(Поступила в редакцию 5-го сентября 2019 г.)

Вычислено сопротивление монослоя комплексов двунитиевых ДНК с квантовыми точками. Показано, что при неконкурентной гибридизации ДНК и при наличии в растворе моновалентных положительно заряженных лигандов имеет место понижение сопротивления по – сравнению с таковым для незаряженных лигандов. Показано, что заряженные лиганды усиливают чувствительности ДНК-чипов по - сравнению с незаряженными.

1. Введение

Быстрое, специфическое обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот имеет большое практическое значение благодаря возможному применению в различных областях для обнаружения патогенов и диагностики генетических заболеваний [1,2]. Среди различных методов обнаружения фотоэлектрохимические методы по-прежнему привлекают значительный интерес в силу их чувствительности, простоты и дешевизны [3,4]. При этом, квантовые точки (КТ) с их уникальными флуоресцентными и фотоэлектрохимическими свойствами являются фотоактивными материалами, крайне перспективными для разработки сенсоров нуклеиновых кислот (далее, ДНК-чипов)

Одним из важных направлений разработки ДНК-чипов является повышение их чувствительности за счет усиления электрического сигнала и стабильности целевого зонда гибридизации. Эффективность ДНК-чипов, в частности, зависит от точности предсказания экспериментальных параметров, отвечающих за термостабильность дуплексов нуклеиновых кислот и время формирования дуплексов ДНК [3]. Некоторые из факторов влияют на термодинамику гибридизации, в частности, поверхностная плотность одноцепочечных ДНК (длина 25– 49 нуклеотидов), иммобилизованных на поверхности, и наличие конкурирующей гибридизации. 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 [1–4].

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 [5–8]. Помимо стабилизации дуплексной формы ДНК, интеркалирующие лиганды влияют на проводимость чувствительного слоя ДНК-чипа.

Подобный подход к повышению чувствительности ДНК-чипа был реализован при разработке новой архитектуры двухцепочечных ДНК, иммобилизованных на подложках электродов, сшитых с наночастицами CdS и структурно контролируемой генерацией фототока при облучении этих массивов светом [9]. Связывание лигандов – интеркаляторов $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ с двойной спиралью ДНК обеспечивает маршруты туннелирования для электронов зоны проводимости и, таким образом, приводит к усилению фототока. На рис.1 представлена сборка ДНК сшитых с наночастицами CdS на Au-электроде. Проводимость ДНК в такой системе регулируется включением окислительно-восстановительных интеркаляторов в двухцепочечную ДНК (дцДНК) [10].

Термодинамика и кинетика гибридизации как в объеме [11, 12], так и на поверхности [4, 13–19] была тщательно изучена в последние годы. Спектр рассматриваемых проблем включает в себя, например, кинетику гибридизации на поверхности [13, 15], влияние солей на гибридизацию ДНК в объеме [12], изотермы гибридизации на поверхности [4] и т. д. В то же время взаимодействия



Рис.1. Схематическое изображение комплексов дцДНК – КТ и оцДНК – зондов, иммобилизованных на поверхности электрода.

ДНК–лиганд также были рассмотрены в большом количестве работ, посвященных интеркаляции [5–8] и связыванию лигандов в малой бороздке [20, 21], их кросс-докингу [22] и т.д. Однако, насколько нам известно, влияние взаимодействий ДНК–лиганд на электропроводность комплексов ДНК с квантовыми точками (КТ) ранее теоретически не рассматривалось. В контексте развития ДНКбиосенсоров, теоретический анализ влияния интеркаляции лигандов на электрохимические свойства комплексов ДНК с наночастицами является необходимым.

Настоящая работа посвящена изучению проводимости монослоя ДНК с привитыми КТ с учетом неконкурентной гибридизации ДНК на поверхности в присутствии 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. Адсорбция оцДНК с привитыми КТ на поверхность электрода

2.1. Гибридизация меченой оцДНК на поверхности электрода и возникновение фототока при облучении

Для распознавания комплементарных ДНК мишеней на поверхности электрода ДНК – чипа создается чувствительная поверхность с иммобилизованными на ней ДНК – зондами, [23]. В качестве мишеней (или зондов) используется оцДНК с привитыми к ним КТ (например, CdS), используемых в качестве меток. В процессе гибридизации комплементарных оцДНК образуется монослой, состоящий, например из комплексов дцДНК – КТ и оцДНК – зондов (см. Рис.1). При взаимодействии электро – магнитного излучения с монослоем имеет место фотовозбуждение КТ, с последующим возникновением свободных носителей заряда (пара электрон – дырочной пары) и, как следствие, фототока в монослое, на основании измерения которого определяется концентрация ДНК – мишени в растворе. Для улучшения чувствительности используются окислительно – восстановительные лиганд – интеркаляторы, связывающиеся с дцДНК [4, 5], такие как $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ [5], доксорубицин, метиленовый синий [4, 5] и т.д. При этом, результирующий фототок может быть обратимо переключен между катодным и анодным направлениями путем контроля окислительно-восстановительного состояния интеркалированных частиц в дцДНК. В частности, предполагается [5], что связывание [Ru(NH₃)₆]³⁺ с дцДНК создает пути туннелирования для электронов проводимости и тем самым усиливает фототок (см. Рис.2).



Рис.2. Перенос заряда от КТ к поверхности электрода в присутствии интеркаляторов.

С нашей точки зрения перенос заряда между интеркалированными лигандами за счет туннелирования представляется сомнительным, поскольку существующие данные скорее свидетельствуют о том, что перенос заряда через ДНК лучше всего может быть описан как механизм множественных, частично когерентных перескоков между делокализованными участками, содержащими основания с плотным стэкингом [10, 24]. Эти области оснований с π -стэкингом между основаниями возникают за счет конформационных изменений в основаниях. Когерентный суперобмен может возникать вдоль областей с π – стэкингом, содержащих в среднем около трех пар оснований. Т.о., перенос заряда в ДНК можно рассматривать как перескоки между смежными областями с π – стэкингом.

2.2. Сопротивление чувствительного слоя

Чувствительный слой ДНК-чипа образован одно- и двухцепочечными ДНК, иммобилизованными на поверхности электрода. При этом, оцДНК обладает намного большим сопротивлением (R_{ss}), чем дцДНК (R_{ds}): $R_{ss} >> R_{ds}$. Предполагается, что дцДНК содержат некоторое количество интеркалирующих лигандов, усиливающих фототок в чувствительном слое ДНК-чипа. Доля оцДНК, гибридизованных с ДНК-мишенями и количество лигандов, связанных с дцДНК на поверхности были оценены в работах [25] для неконкурентной гибридизации как

$$\frac{x(1-r)^{N}}{1-x} = c_{t}K_{t}\exp\left[-\Gamma\left(1+x-zrx\right)\right]$$

$$\frac{r}{1-r} = c_{l}K_{l}\exp\left[\frac{\Gamma}{N}(1+x-zrx)\right],$$
(1)

где введены следующие обозначения: x – доля гибридизованных оцДНК – мишеней на поверхности электрода; r – степень заполнения дцДНК лигандом–интеркалятором; N – число пар оснований в дцДНК на поверхности; z – заряд лиганда; c_t и c_l – концентрации оцДНК-мишеней и лигандов в растворе, соответственно; K_t и K_l – константы связывания оцДНК-мишеней и лигандов в растворе, соответственно; $\Gamma = 8\pi N \sigma_0 l_B r_D^2 / H$ и $\sigma_0 = N N_0 / A$, где N_0 – общее число оцДНК-зондов на поверхности, A – площадь поверхности электрода, l_B – длина Бьоррума, r_D – радиус экранирования Дебая, H – толщина поверхностного слоя. Зависимость доли x от концентрации оцДНК-мишеней в растворе называется изотермой гибридизации и представлена на Рис.3.



Рис.3. Изотермы гибридизации для моновалентного положительного заряженного лиганда (1), для незаряженных лигандов (2), степень заполнения гибридов зонд-мишень для моновалентных лигандов (3), сдвиг изотермы гибридизации от случая незаряженного лиганда к заряженному (4). Кривые получены для следующих значений параметров: $l_{\rm B} \approx 7$ Å, $r_D \approx 3$ Å, N = 16, $K_t = 10^9 M^{-1}$.

Сопротивление монослоя дцДНК, показанного на Рис.1, соответствует параллельному подключению xN_0 сопротивлений R_{ds} . Следовательно, общее сопротивление монослоя оценивается как

$$R = R_{ds} / (xN_0). \tag{2}$$

Согласно результатам, полученным в [24], сопротивление ДНК как правило увеличивается линейно с длиной, что характерно для механизма некогерентных перескоков. Однако для последовательностей ДНК со стэкингом GC – пар, на линейную зависимость длины накладывается периодическое колебание, указывающее на частичную когерентность транспорта. Здесь мы для простоты будем предполагать малое содержание GC – пар, или же высокую GC – специфичность интеркаляторов и оценивать сопротивление субцепи из *n* пар оснований между двумя ближайшими интеркаляторами как [24]

$$R(\mathbf{n}) = \frac{2}{e^2 \rho(\mathbf{E}_F) \mathbf{k}_i} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) + \frac{n-1}{e^2 \rho(E_F) k} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right),$$
(3)

где $\rho(E_F)$ – плотность состояний на уровне Ферми, k_l – скорость переноса заряда от лиганда к соседней паре оснований, k – скорость переноса заряда между соседними парами оснований и E_a – энергия активации. Если r – степень заполнения дцДНК лигандом–интеркалятором, то среднее число лигандов в дуплексной ДНК оценивается как m = Nr, а средняя длина цепи дцДНК между соседними интеркалированными лигандами как n = 1/r. Тогда сопротивления одного комплекса дцДНК–КТ можно оценить как

$$R_{ds} = \frac{\exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)}{e^2 \rho(E_F)} \left[\frac{2Nr+1}{k_l} + \frac{1}{k_{QD}} + \frac{N(1-r)+1/r-1}{k}\right].$$
 (4)

Поскольку, общее число комплексов дцДНК–КТ оценивается как $N_{pt} = xN_0$, то общее сопротивление монослоя будет равно

$$R = R_{ds} / (xN_0). \tag{5}$$

Зависимость общего сопротивления монослоя от приведенной концентрации оцДНК – мишеней в растворе приведена на Рис.4.



Рис.4. Зависимость сопротивления монослоя дцДНК – КТ от приведенной концентрации оцДНК – мишеней в растворе. Сплошной линией представлено сопротивление в присутствии моновалентных положительно заряженных лигандов, пунктирной – лигандов без заряда. Кривые получены для следующих значений параметров: $l_{\rm B} \approx 7$ Å, $r_D \approx 3$ Å, N = 16, $K_t = 10^9 M^{-1}$

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 были получены в работе [25], где было показано, что изотерма гибридизации для незаряженных лигандов имеет вид

$$\frac{x}{1-x} = c_t \tilde{K}_t e^{-\Gamma(1+x)}, \qquad (6)$$

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 также 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.

3.2. Влияние моновалентных интеркалирующих лигандов на сопротивление чувствительного слоя оц-ДНК – чипа

Сопротивление монослоя комплексов дцДНК–КТ в присутствии заряженных и электронейтральных интеркалирующих лигандов представлено на Рис.4. В частности, показано, что заряд лиганда приводит к понижению общего сопротивления чувствительного слоя ДНК-чипа, что, в свою очередь, усиливает интенсивность фототока при заданной степени гибридизации оцДНК-зондов, иммобилизованных на поверхности. При этом, сопротивление чувствительного слоя ДНК-чипа существенно зависит от концентрации оцДНК-мишеней в растворе, что позволяет использовать измерение фототока для оценки их концентрации.

4. Заключение

Исследованы термодинамические свойства поверхности ДНК-чипа с привитыми к ней оцДНК-зондами, взаимодействующие с оцДНК-мишенями и лигандами в растворе. Для случаев неконкурентной гибридизации ДНК на поверхности рассчитана зависимость сопротивления чувствительного слоя ДНК – чипа в зависимости от концентрации оцДНК-мишеней в растворе. Показано, что сопротивление существенно зависит как от концентрации оцДНК-мишеней в растворе, так и от заряда лигандов – интеркаляторов, взаимодействующих с дуплексной ДНК. Проведенный анализ показывает, что связывание с заряженными интеркалирующими лигандами приводит к увеличению чувствительности ДНК-чипов по - сравнению с таковой для электронейтральных лигандов.

ЛИТЕРАТУРА

- D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins. Biosensors and Bioelectronics, 14, 599 (1999).
- 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).
- P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Shahinyan. J. Biomol. Struct. Dyn., DOI: 10.1080/07391102.2019.1630006 (2019).
- A.A. Ghazaryan, Y.B. Dalyan, S.G. Haroutiunian, A. Tikhomirova, T.V. Chalikian. J. Amer. Chem. Soc., 128, 1914 (2006).
- 8. R.F. Pasternack, J.I. Goldsmith, S. Szep, E.J. Gibbs. Biophys.J., 75, 1024 (1998).
- 9. I. Willner, F. Patolsky, J. Wasserman. Angew Chem. Int. Ed., 40, 1861 (2001).
- 10. M.A. O'Neill, J.K. Barton. J. Am. Chem. Soc., 126, 11471 (2004).
- D.M. Hinckley, G.S. Freeman, J.K. Whitmer, J.J. de Pablo. J. Chem. Phys., 139, 144903 (2013).
- 12. D.M. Hinckley, J.P. Lequieu, J.J. de Pablo. J. Chem. Phys., 141, 035102 (2014).
- 13. A.W. Peterson, R.J. Heaton, R.M. Georgiadis. Nucl. Acids Res., 29, 5163 (2001).
- 14. A. Halperin, A. Buhot, E.B. Zhulina. Biophys. J., 86, 718 (2004).
- 15. M.F. Hagan, A.K. Chakraborty. J.Chem. Phys., 120, 4958 (2004).
- 16. M.M.A. Seckar, W. Bloch, P.M.S. John. Nucleic Acids Res., 33, 366 (2005).
- 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).
- 18. D. Irving, P. Gong, R. Levicky. J. Phys. Chem. B, 114, 7631 (2010).
- 19. T.J. Schmitt, T.A. Knotts IV. J. Chem. Phys., 134, 205105 (2011).
- 20. S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 623, 24 (2007).
- 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).
- 22. C.G. Ricci, P.A. Netz. J. Chem. Inf. Model., 49, 1925 (2009).
- 23. D. Ba, I.H. Boyaci. Anal. Bioanal. Chem., 400, 703 (2011).
- 24. L. Xiang, J.L. Palma, C. Bruot, V. Mujica, M.A. Ratner, N. Tao. Nature Chem., 7(3), 221 (2015).
- 25. Sh.A. Tonoyan, A.A. Hakobyan, A.K. Andreassian, V.F. Morozov, Y.Sh. Mamasakhlisov. J. Contemp. Phys. (Armenian Ac. Sci.), 53, 179 (2018).

ጉህԹ – ՔՎԱՆՏԱՅԻՆ ԿԵՏ ԿՈՄՊԼԵՔՄՆԵՐԻ ՄՈՆՈՇԵՐՏԻ ԿՈՆԴՈՒԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԻՋՆՈՐԴԱՎՈՐՎԱԾ ԼԻՑՔԱՎՈՐՎԱԾ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

Ա.Ե. ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ, Է.Մ. ԿԱԶԱՐՅԱՆ, Շ.Ա. ՏՈՆՈՅԱՆ, Վ.Ֆ. ՄՈՐՈԶՈՎ, Ե.Շ. ՄԱՄԱՍԱԽԼԻՍՈՎ

Հաշվարկվել է երկկողմանի ԴՆԹ-ի համալիրների քվանտային կետերով համալիրների միաձուլման դիմադրությունը։ Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի ոչ մրցակցային հիբրիդացումով և լուծույթում մոնովալենտ դրականորեն լիցքավորված լիգանների առկայության դեպքում, դիմադրության նվազում է առաջանում, համեմատած դրա հետ, չլրացված լիգանների համար։ Ցույց է տրվել, որ լիցքավորված լիգաները ուժեղացնում են ԴՆԹ չիպսերի զգայունությունը ՝ համեմատած լիցքավորվածների հետ։

THE CONDUCTIVITY OF THE MONOLAYER OF DNA – QUANTUM DOT COMPLEXES IN THE PRESENCE OF INTERCALATING CHARGED LIGANDS

A.Y. MAMASAKHLISOV, E.M. KAZARYAN, S.A. TONOYAN, V.F. MOROZOV, Y.S. MAMASAKHLISOV

The resistance of a monolayer of complexes of double-stranded DNA with quantum dots was calculated. It was shown that with non-competitive DNA hybridization and in the presence of monovalent positively charged ligands in the solution, a decrease in resistance occurs compared to that for uncharged ligands. It has been shown that charged ligands enhance the sensitivity of DNA chips compared to uncharged ones.