



Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

ДВУХСТАДИЙНАЯ КИНЕТИКА АДСОРБЦИИ ПРОТЯЖЕННЫХ ЛИГАНДОВ НА ДНК

В.Б. АРАКЕЛЯН¹, М.А. ЭЛИЗБАРЯН², П.О. ВАРДЕВАНИАН¹

¹Ереванский госуниверситет, биол.факультет, каф. биофизики,
E.mail: biophys_dep@mail.ru

²Российско-армянский (славянский) университет, каф. математической кибернетики

В работе построена математическая модель двухстадийной кинетики адсорбции протяженных лигандов на дуплексах ДНК. Одна из стадий - это диффузия лигандов к адсорбционным центрам, другая - непосредственное связывание лиганда с местом адсорбции. Получена система нелинейных дифференциальных уравнений, описывающих процесс связывания. На основе численного решения системы нелинейных уравнений получена изотерма адсорбции. Показано, что в зависимости от соотношения между константами скоростей адсорбции и десорбции лигандов на ДНК и скоростью диффузии лиганда в растворе могут реализовываться как экспоненциальная, так и S - образная кинетика адсорбции.

*Адсорбция лигандов - ДНК – кинетика адсорбции лигандов-
нелинейные уравнения*

Աշխատանքում բերված է ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի հետ երկայնաձիգ լիգանդների կապման երկփուլ կինետիկայի մաթեմատիկական մոդելը: Առաջին փուլն իրենից ներկայացնում է կապման կենտրոնի վրա լիգանդների դիֆուզիան, իսկ երկրորդը՝ կապման տեղին լիգանդի անմիջական կապումը: Ստացված է ոչ գծային դիֆերենցիալ հավասարումների համակարգ, որը նկարագրում է կապման պրոցեսը: Ոչ գծային հավասարումների համակարգի թվային լուծման արդյունքում ստացվել է կապման կորը: Ցույց է տրվել, որ կախված ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման և պոկման արագությունների հաստատունների և լուծույթում լիգանդների դիֆուզիայի արագության միջև հարաբերությունից, կապման կինետիկան կարող է լինել ինչպես էքսպոնենցիալ, այնպես էլ S-աձև:

ԴՆԹ (լիգանդների ադսորբցիա (լիգանդների ադսորբցիայի կինետիկա (ոչ գծային հավասարումներ

In present work the mathematical model of two-phases kinetics of adsorptions of extended ligands on DNA duplexes has been constructed. One of the stages is diffusion of ligands to adsorption centers, and other stage is direct binding of ligands to adsorption site. The system of nonlinear differential equations describing the binding process was obtained. Based on the numerical resolution of system of the nonlinear equations the adsorption isotherm was obtained. It was shown that in dependence on ratio between rate constants of adsorption and desorption of ligands on DNA and rate of ligands diffusion in a solution both exponential as well as S - shape kinetics of adsorption may occur.

*DNA – adsorption of ligands – kinetics of ligands adsorption
– non linear equations*

В основе всех молекулярных ДНК-биосенсоров лежит регистрирование события высокоспецифического распознавания последовательностей нуклеиновых кислот [2,6,8]. Молекула ДНК является самой подходящей для использования в биосенсорах, так как взаимодействие между двумя комплементарными цепями ДНК является специфичным и достаточно прочным. В типичной конфигурации одноцепочная ДНК-мишень иммобилизована на подложке и образует слой распознавания. Если в растворе есть одноцепочные ДНК, комплементарные ДНК-мишеням, то образуются дуплексы ДНК. Образование дуплекса активизирует сигнал, который, преобразовываясь в электрические импульсы, передается регистрирующему устройству [9]. Отметим, что дуплексы ДНК, как правило, окружены большим количеством лигандов разного типа, адсорбция которых на ДНК дуплексах может сильно влиять на процесс формирования выходного сигнала биосенсора. Так как процессу непосредственного связывания лиганда с адсорбционным центром на ДНК (кинетическая стадия) предшествует диффузия лиганда из глубинных слоев раствора к адсорбционному центру (диффузионная стадия), то в первую очередь следует выяснить, как влияет диффузия в растворе на кинетику адсорбции лиганда [3,4,5,7]. В данной работе исследована кинетика связывания протяженных лигандов с ДНК дуплексами в условиях, когда следует учитывать диффузионную стадию.

Теоретическая часть. Рассмотрим адсорбцию в среде с единичным объемом. В этом случае число частиц в системе будет равно его концентрации. При переходе от конечных объемов к произвольным следует переопределить концентрации. По аналогии с [4] запишем систему уравнений, которая описывает кинетику адсорбции лигандов на ДНК с учетом как диффузионной стадии, так и кинетической. Диффузию лигандов в растворе опишем стандартным способом с помощью нестационарного уравнения диффузии

$$\frac{\partial c_L(x,t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x,t)}{\partial x^2}, \quad (1)$$

где $C_L(x,t)$ число молекул лигандов в растворе; D_L - коэффициент диффузии лигандов. Кинетическую стадию адсорбции протяженных лигандов на ДНК представим как квазихимическую реакцию связывания лиганда (L) из раствора со свободным адсорбционным местом (M) на ДНК [3]



где (LM) – комплекс лиганда с ДНК; k_1 и k_{-1} - константы скорости образования и распада комплекса (LM) соответственно. Исходя из (2), можно написать следующее балансное уравнение, описывающее изменение числа адсорбированных на ДНК лигандов $C_{LA}(x,t)$ в виде

$$\frac{\partial C_{LA}}{\partial t} = t^+(C_{LA}) - t^-(C_{LA}), \quad (3)$$

где $t^+(C_{LA})$ и $t^-(C_{LA})$ - число лигандов, адсорбирующихся и десорбирующихся на ДНК в единицу времени соответственно. Выражение для $t^-(C_{LA})$ определяется легко. Поскольку на ДНК адсорбировано C_{LA} лигандов, то число десорбирующихся лигандов в единицу времени равно $k_{-1}C_{LA}$, т.е.

$$t^-(C_{LA}) = k_{-1}C_{LA}, \quad (4)$$

Для определения $t^+(C_{LA})$ запишем его в виде

$$t^+(C_{LA}) = k_1 C_L M_{LA}, \quad (5)$$

где M_{LA} - число свободных мест на ДНК, способных связать лиганд. При определении M_{LA} представим ДНК в виде одномерного кристалла с N мест связывания, а лиганд, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает n подряд расположенных мест на ДНК. В этом случае, следуя работе [1], для M_{LA} можно получить следующее выражение

$$M_{LA} = \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}). \quad (6)$$

Подставив (6) в (5) для $t^+(C_{LA})$, получим

$$t^+(c_{LA}) = k_1 c_L \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}). \quad (7)$$

Подставив (4) и (7) в (3), получим следующее окончательное уравнение, описывающее изменение числа адсорбированных на ДНК лигандов $c_{LA}(x, t)$ в виде

$$\frac{\partial c_{LA}}{\partial t} = k_1 c_L \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) - k_{-1} c_{LA}. \quad (8)$$

Поскольку в начальный момент времени все адсорбционные места на ДНК свободны, т.е. нет адсорбированных лигандов на ДНК, то начальное условие к уравнению (8) следующее

$$c_{LA}(x, 0) = 0. \quad (9)$$

Исходя из кинетической схемы, легко заметить, что

$$\frac{\partial c_{LA}}{\partial t} = - \frac{\partial c_L}{\partial t}. \quad (10)$$

Так как изменение концентрации лигандов как в объеме, так и во времени происходит в результате диффузии и квазихимической реакции связывания лиганда с адсорбционным местом на ДНК, то уравнение, описывающее изменение числа молекул лигандов в растворе, будет иметь вид

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_L(x, t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x, t)}{\partial x^2} - \\ - k_1 c_L \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) + k_{-1} c_{LA}. \end{aligned} \quad (11)$$

Для того, чтобы решить уравнение (11) следует задать начальное и граничные условия. Поскольку в начальный момент времени в области, где находятся молекулы ДНК, не было лигандов, то начальное условие к уравнению (11) следующее

$$c_L(x, 0) = 0. \quad (12)$$

На границе с объемным раствором концентрация лиганда постоянна и равна C_{L_0} , а подложка непроницаема для лигандов. Учитывая это, имеем следующие граничные условия

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial c_L(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \\ c_L(l, t) = c_{L_0}. \end{aligned} \quad (13)$$

Таким образом, система уравнений, описывающая двухстадийную кинетику адсорбции протяженных лигандов на ДНК, будет иметь следующий окончательный вид:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_L(x, t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x, t)}{\partial x^2} - \\ - k_1 c_L \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) + k_{-1} c_{LA} \end{aligned} \quad (11a)$$

$$\frac{dc_{LA}}{dt} = k_1 c_L \left(\frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) - k_{-1} c_{LA}. \quad (8a)$$

Граничные и начальные условия системы уравнений (11а) и (8а) являются (9), (12) и (13). После решения системы уравнений (11а) и (8а) можно определить изотерму адсорбции по формуле

$$c_{LA}(t) = \int_0^l c_{LA}(x, t) dx. \quad (14)$$

Система уравнений (11а) и (8а) нелинейна и не имеет аналитического решения. Для анализа кинетики двухстадийной адсорбции протяженных лигандов на ДНК систему уравнений (11а) и (8а) следует решить численно. Для этого перепишем систему (11а) и (8а), граничные и начальные условия (9), (12) и (13) в безразмерном виде.

$$\frac{\partial c_1(x, t)}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 c_1(x, t)}{\partial \xi^2} - \alpha c_1 \left(\frac{1 - nc_2}{1 - (n-1)c_2} \right)^n (1 - (n-1)c_2) + \beta_1 \beta c_2 \quad (11б)$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial \tau} = \frac{\alpha}{\beta_1} c_1 \left(\frac{1 - nc_2}{1 - (n-1)c_2} \right)^n (1 - (n-1)c_2) - \beta c_2 \quad (8б)$$

$$c_1 = c_L / c_{L_0}, \quad c_2 = c_{LA} / N, \quad \xi = x / l, \quad \tau = t \cdot D_L / l^2$$

$$\alpha = \frac{l^2 k_1 N}{D_L}, \quad \beta = \frac{l^2 k_{-1}}{D_L}, \quad \beta_1 = \frac{N}{c_{L_0}}.$$

Численно решив уравнения (11б) и (8б), можно определить кинетику заполнения адсорбционных центров на ДНК дуплексе по формуле

$$\theta(\tau) = \int_0^1 c_2(\xi, \tau) d\xi. \quad (15)$$

Результаты и обсуждение. Поскольку в подавляющем большинстве случаев $N < c_{L_0}$, то из анализа системы (11б) и (8б) следует, что параметр β_1 меньше единицы. Параметры α и β положительны и могут быть как больше, так и меньше единицы. Для анализа влияния стадийности на кинетику адсорбции лигандов на ДНК примем, что заданы концентрации лигандов в объеме раствора и число адсорбционных центров. Зафиксируем параметр β_1 и будем варьировать параметры α и β . Результаты численного интегрирования уравнений (11б) - (8б) и (15) представлены на рис.1 А и Б. Из рис.1А видно, что с увеличением константы скорости десорбции (нижняя кривая) степень заполнения уменьшается.

Двухстадийная кинетика при определенном соотношении между параметрами может привести к S - образной кинетике заполнения дуплексов лигандами. Это обстоятельство показано на рис.1 Б. В случае быстрой диффузии может реализоваться экспоненциальная кинетика связывания лигандов с ДНК.

Построенная в данной работе математическая модель двухстадийной кинетики адсорбции протяженных лигандов на дуплексах ДНК относится к случаю, когда объемный раствор непосредственно примыкает к иммобилизованным молекулам ДНК. В зависимости от соотношения констант скоростей адсорбции и десорбции протяженных лигандов на ДНК и скоростью диффузии лиганда в растворе могут реализоваться различные варианты адсорбции.

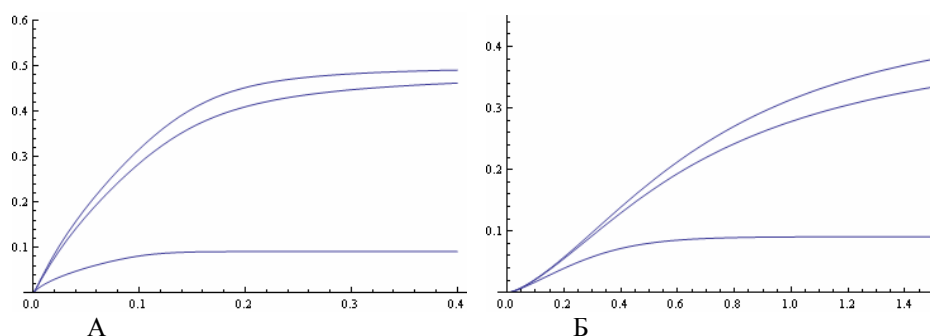


Рис. 1. Двухстадийная кинетика адсорбции лигандов на ДНК.

По оси X безразмерное время, τ , по оси Y степень заполнения ДНК θ .

На всех кривых $\beta_1 = 0.1$, $n=2$. На А- $\alpha = 10$, на Б- $\alpha = 0.1$.

Значения β на кривых $\beta = 0.01$, $\beta = 1$, $\beta = 10$ (сверху вниз).

ЛИТЕРАТУРА

1. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. *Биофизика*, 48, с. 773-796, 2003.
2. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия. *Мол. биол.*, 18, с. 798-812, 1984.
3. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation function. *J. Biomol. Str. Dyn.* 18, 2, 231-235, 2000.
4. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. *Biopolymers*, 6, 575-584, 1968.
5. McGhee J.D. and von Hippel P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Inter-actions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.*, 86, 469-489, 1974.
6. Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Kinetics of Ligand Binding to Nucleic Acids, *JBSD*, 24, 2, 479-484, 2006.
7. Arakelyan V.B., Elizbaryan M.A., Asatryan D.G. Mathematical modeling of kinetics of ligands adsorption on DNA, International Conference DAAD Alumni Seminar «Biotechnology and Health-3», Yerevan, Armenia, 10-13, 2009.
8. Bishop J., Blair S., Chagovetz A.M. A Competitive Kinetic Model of Nucleic Acid Surface Hybridization in the Presence of Point Mutants. *Biophysical J.* 90, 381-840. 2006.
9. Chan V., Graves D.J., Fortina P., McKenzie. Absorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces, *Langmuir*, 13, 320-329, 1997.
10. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J. Electrochemical DNA sensors, *Nat. biotechnology*, 21, 10, 1192-1199, 2003.
11. Erickson D., Li D., Krull U.J. Modeling of DNA Hybridization Kinetic for Spatially Resolved biochips. *Analytical Biochemistry* 317, 186-200, 2003.
12. Hagan M.F., Chakraborty A.K. Hybridization dynamics of surface immobilized DNA. *J.Chem. Phys.* 120, p.4958-4968, 2004.
13. Palecek E., Fojta M., Jelen F. New approaches in the development of DNA sensors. Hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. *Bioelectrochemistry*, 56, p.85-90, 2002.

Поступила 20.11.2009.