



Биол. журн. Армении, 3 (62), 2010

ФЛУКТУАЦИИ ВЫХОДНОГО СИГНАЛА ДНК-БИОСЕНСОРА ПРИ НАЛИЧИИ ВНУТРЕННЕГО ШУМА

Г.А. АВЕТИСЯН¹, В.Б. АРАКЕЛЯН¹, А.Т. КАРАПЕТЯН²

¹Ереванский государственный университет

²Ереванский государственный университет архитектуры и строительства

В работе определены характерные особенности действия концентрации лигандов в растворе на флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора. Рассмотрен случай произвольного заполнения ДНК дуплексов лигандами. Показано, что дисперсия выходного сигнала ДНК-биосенсора с увеличением концентрации лигандов в растворе вначале увеличивается, а затем, проходя через максимум, уменьшается и стремится к нулю при дальнейшем увеличении концентрации лигандов в растворе. Вычислены корреляционная функция и спектральная плотность выходного сигнала ДНК-биосенсора. Определены их характерные особенности.

*ДНК-биосенсор – флуктуация и дисперсия выходного сигнала –
спектральная плотность*

Աշխատանքում որոշված են ԴՆԹ-կենսասենսորի էլքային ազդակի ֆլուկտուացիաների վրա լուծույթում լիգանդների առանձնահատկությունները: Դիտարկված է լիգանդներով ԴՆԹ-ի դուպլեքսների կամայական հագեցման դեպքը: Ցույց է տրված, որ ԴՆԹ-կենսասենսորի էլքային ազդակի դիսպերսիան լուծույթում լիգանդների կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց սկզբում աճում է, այնուհետև մաքսիմումով անցնելով նվազում է և լուծույթում լիգանդների կոնցենտրացիայի հետագա աճի դեպքում, ձգտում է զրոյի: Հաշվարկված են ԴՆԹ-կենսասենսորի էլքային ազդակի կորելյացիոն ֆունկցիան և սպեկտրալ խտությունը: Որոշված են դրանց բնութագրական առանձնահատկությունները:

*ԴՆԹ-կենսասենսոր - էլքային ազդակի ֆլուկտուացիա և դիսպերսիա -
սպեկտրալ խտություն*

The peculiarities of the ligand effect on fluctuations of output signal of DNA-biosensors in the solution have been determined in present work. The case of DNA duplex arbitrary fillings with ligands has been observed. It is shown, that at first the dispersion of DNA-biosensor output signal increases with the rising of ligand concentration, then passing through the maximum point tends to zero, with the further rising of ligand concentration. The correlation function and spectral density of the output signal of DNA-biosensor have been calculated. Their characteristic peculiarities have been determined.

DNA-biosensor – fluctuation and dispersion of output signal – spectral density

В последние годы для решения широкого круга биомедицинских проблем, связанных с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, а также для решения задач генетической диагностики [6], стали применяться ДНК-биосенсоры. В ДНК-биосенсорах детектируется взаимодействие олигонуклеотида, закреплен-

ного на поверхности преобразователя сигнала, с комплементарными участками олигонуклеотидов пробы. Происходит процесс гибридизации, т.е. связывание нуклеотидов в устойчивые пары аденин-тимин и гуанин-цитозин с образованием спиральной двунитовой ДНК. Такие взаимодействия отличаются высокой специфичностью. Они позволяют регистрировать не только комплементарное связывание, но и влияние на него различных факторов [7]. Создаваемые ДНК-биосенсоры, подобно другим биосенсорам, обеспечивают быструю и прямую детекцию как с использованием, так и без использования каких бы то ни было меток. Развитие биосенсорных технологий сыграло решающую роль в научно-методическом и технологическом обеспечении расшифровки генома человека [8]. Важной задачей является определение эффективных лекарственных доз противораковых препаратов, отличающихся высокой токсичностью. В связи с этим ДНК-биосенсоры могут служить удобными моделями для изучения процессов *in vitro* в фармакологии как при определении эффективных доз высокотоксичных ДНК-активных фармакологических препаратов, так и при оценке специфичности связывания лекарственных препаратов с ДНК, выяснению механизмов регуляторного или повреждающего их действия на ДНК. С практической точки зрения важным является то обстоятельство, что технологии, связанные с ДНК-биосенсорами, имеют значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, т.к. они позволяют миниатюризировать исследуемый образец и анализатор, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения, а также одновременно определять различные параметры исследуемого образца, причем без потери чувствительности. Однако миниатюризация неизбежно приводит к повышению уровня шумов выходного сигнала ДНК-биосенсора. Это связано с общими положениями статистической физики, согласно которым с уменьшением размеров системы увеличиваются относительные флуктуации в физико-химических системах [4], которые часто называют внутренним шумом системы. Внутренний шум влияет на формирование выходного сигнала ДНК-биосенсора. В связи с этим становится актуальным и важным исследование влияния внутреннего шума ДНК-биосенсора на флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора, определение характерных особенностей этих флуктуаций.

Теоретическая часть. Теоретический расчет влияния внутреннего шума на величину выходного сигнала ДНК-биосенсора проведем в рамках модели формирования выходного сигнала, которая была описана в работе [1]. Считая, что величина выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу ДНК дуплексов N_d

$$I(t) = I_0 + N_d \beta \cdot x(t), \quad (1)$$

в [1] было показано, что среднее значение выходного сигнала $\overline{I(t)}$ ДНК-биосенсора и его дисперсия $\overline{\Delta I^2}$ равны

$$\overline{I(t)} = I_0 + N_d \beta \cdot \overline{x(t)} \quad (2)$$

$$\overline{\Delta I^2} = N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot \overline{\Delta x^2} \quad (3)$$

$$(I_0 = N_d I_d),$$

где I_d – величина выходного сигнала от одного дуплекса; β – коэффициент пропорциональности, который равен изменению величины выходного сигнала при адсорбции одной молекулы лиганда на ДНК дуплексе и имеет размерность выходного сигнала; $\overline{x(t)}$ – среднее число лиган-

дов, адсорбированных на одном ДНК дуплексе; $\overline{\Delta x^2}$ – дисперсия числа лигандов, адсорбированных на одном ДНК дуплексе. Из (2) и (3) видно, что вычисление среднего значения выходного сигнала ДНК-биосенсора и его дисперсии сводится к вычислению среднего числа адсорбированных на ДНК дуплексе лигандов и его дисперсии. В работе [1] среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора $\overline{I(t)}$ и его дисперсия $\overline{\Delta I^2}$ были вычислены для случая малых заполнений. В данной работе будет рассмотрен более общий случай произвольных заполнений, и, помимо $\overline{I(t)}$ и $\overline{\Delta I^2}$, будут вычислены также корреляционная функция выходного сигнала и его спектральная плотность. Как в [2] принимаем, что число адсорбционных центров на ДНК дуплексе равно числу пар оснований N_p , а один адсорбированный лиганд занимает n подряд расположенных адсорбционных центров на ДНК дуплексе. Используя результаты работы [2], можно написать следующие выражения для стационарного значения среднего числа адсорбированных на ДНК дуплексе лигандов $\left(\overline{x}\right)_{st}$ и дисперсии $\left(\overline{\Delta x^2}\right)_{st}$ в виде

$$\frac{\left(\overline{x}\right)_{st}}{N_p} = \sum_x x \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) \quad (4)$$

$$\frac{\left(\overline{\Delta x^2}\right)_{st}}{N_p} = \sum_x x^2 \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) - \quad (5)$$

$$\left(\sum_x x \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) \right)^2,$$

где суммирование по x проводится до максимальных заполнений, K – константа равновесия при адсорбции лигандов на ДНК дуплексе, c_f – концентрация лигандов в растворе. Из (2) и (3) с учетом (4) и (5) можно получить следующие стационарные значения выходного сигнала ДНК-биосенсора $\left(\overline{I}\right)_{st}$ и его дисперсии $\left(\overline{\Delta I^2}\right)_{st}$

$$\left(\overline{I}\right)_{st} = I_0 + N_d \beta \cdot N_p \sum_x x \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \left(\overline{\Delta I^2}\right)_{st} = N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p \left(\sum_x x^2 \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) - \right. \\ \left. - \left(\sum_x x \cdot \left(\prod_{z=1}^x \frac{Kc_f(N_p - (z-1)n)^n}{z(N_p - (z-1)(n-1))^{n-1}} \right) \right)^2 \right). \end{aligned} \quad (7)$$

Исходя из (1) и определения корреляционной функции [3], можно найти следующую связь между стационарной корреляционной функцией выходного сигнала ДНК-биосенсора $C_I(t)$ и стационарной корреляционной функцией $C_x(t)$

$$C_I(t) = (N_d \beta)^2 \cdot C_x(t). \quad (8)$$

Стационарную корреляционную функцию $C_x(t)$ вычислим используя теорему регрессии [3]. Согласно этой теореме, стационарная корреляционная функция X определяется как произведение стационарной дисперсии $\left(\overline{\Delta x^2}\right)_{st}$ на временной экспоненциальный релаксационный множитель. В работе [5] вычислено время релаксации где τ – число

$$\tau = \frac{(1 - \bar{n}r)(1 - (n-1)\bar{r})}{k_{-1}} \quad (9)$$

$$\bar{r} = \bar{x} / N_p,$$

адсорбированных лигандов на пару оснований ДНК, k_{-1} - константа скорости распада комплекса лиганда с ДНК дуплексом. Учитывая (5), (7), (8), (9) и на основании теоремы регрессии [3], можно выписать следующее окончательное выражение для стационарной корреляционной функции выходного сигнала ДНК-биосенсора

$$C_1(t) = \left(\overline{\Delta I^2} \right)_{st} \times \exp(-t / \tau). \quad (10)$$

При известном значении корреляционной функции (10) по формуле

$$S_I(\omega) = 2 \int_0^{\infty} \cos(t\omega) C_1(t) dt \quad (11)$$

легко вычислить спектральную плотность выходного сигнала ДНК-биосенсора. Подставив (10) в (11), после несложных вычислений получим

$$S_I(\omega) = \frac{S_I(0)}{1 + (\omega / \omega_c)^2},$$

$$S_I(0) = 2 \left(\overline{\Delta I^2} \right)_{st} \cdot \tau, \quad \omega_c = \frac{1}{\tau}. \quad (12)$$

Из (12) видно, что спектральная плотность выходного сигнала ДНК-биосенсора имеет лоренцевский вид. Частота ω_c соответствует той частоте, при которой амплитуда спектральной плотности уменьшается в два раза. Часто эту частоту называют частотой “завала”.

Результаты и обсуждение. Исследуем зависимость выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе. Из (6) и (7) видно, что если в растворе отсутствует лиганд, т.е. когда $c_f = 0$, стационарное значение выходного сигнала ДНК-биосенсора равно I_0 , а стационарное значение дисперсии выходного сигнала равно нулю. Из (6) видно также, что с увеличением концентрации лигандов в растворе c_f выходной сигнал также увеличивается. Представляет интерес сопоставить зависимости относительного увеличения стационарного значения выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе для случая с произвольным заполнением (6) со случаем малых заполнений, полученным в работе [1]

$$\left(\bar{I} \right)_{st} = I_0 + N_d \beta \cdot \frac{Kc_f N_p}{1 + (2n-1)Kc_f}. \quad (13)$$

На рис.1 представлена зависимость относительного увеличения стационарного значения выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов в растворе.

Параметр $(N_d \beta \cdot N_p) / I_0$ показывает эффективность влияния адсорбированных лигандов на величину выходного сигнала. С его увеличением растет относительное увеличение стационарного значения выходного сигнала ДНК-биосенсора. Из рис.1 видно, что величина выходного сигнала ДНК-биосенсора монотонным образом зависит от концентрации лигандов в растворе. Из рис.1

видно также, что при малых концентрациях лигандов в растворе зависимости относительного увеличения стационарного значения выходного сигнала ДНК-биосенсора при произвольных и малых заполнениях совпадают.

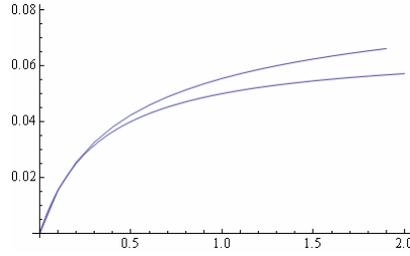


Рис. 1. Зависимость относительного увеличения стационарного значения выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов в растворе при $n = 2$.

По оси Y отложены $\left(\overline{I}\right)_{st} - I_0 / I_0$, по оси X отложены Kc_f .

Верхняя кривая построена по формуле (6), нижняя кривая построена по формуле (13).

На обеих кривых параметр $(N_d \beta \cdot N_p) / I_0 = 0.2$.

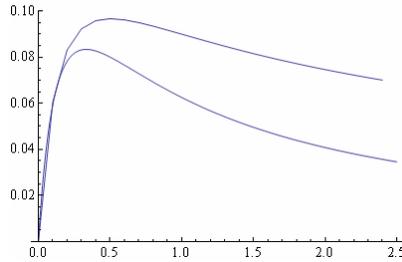


Рис. 2. Зависимость безразмерной стационарной дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов при $n = 2$.

По оси Y отложены $\left(\overline{\Delta I^2}\right)_{st} / (N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p)$, по оси X отложены Kc_f .

Верхняя кривая построена по формуле (7), нижняя кривая построена по формуле (14).

При больших концентрациях лигандов в растворе кривая для произвольных заполнений идет выше. Это связано с тем, что при больших концентрациях лигандов в растворе изотерма адсорбции для малых заполнений приближенно описывает процесс адсорбции [2]. Сопоставим зависимости дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе для случая с произвольным заполнением (7) со случаем малых заполнений, полученным в работе [1]

$$\left(\overline{\Delta I^2}\right)_{st} = N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p \frac{Kc_f}{(1 + (2n-1)Kc_f)^2} \quad (14)$$

На рис.2 представлена зависимость безразмерной стационарной дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов.

Из рис.2 видно, что дисперсия выходного сигнала немонотонно зависит от концентрации лиганда в растворе. При малых концентрациях лиганда дисперсия растет с увеличением концентрации. Далее с увеличением концентрации лиганда дисперсия достигает максимального значения и при стремлении его к бесконеч-

ности дисперсия стремится к нулю. Из рис.2 видно также, что при малых концентрациях лигандов в растворе кривые зависимости дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе при произвольных и малых заполнениях совпадают. При больших концентрациях лигандов в растворе кривая для произвольных заполнений идет выше.

Совместное рассмотрение формул (7), (9) и (10) позволяет исследовать зависимость стационарной корреляционной функции выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе. На рис.3 представлена зависимость стационарной корреляционной функции выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерного времени при различных значениях безразмерной концентрации лигандов в растворе.

Из рис.3 видно, что с увеличением безразмерного времени стационарная корреляционная функция выходного сигнала ДНК-биосенсора уменьшается и при продолжительности периода времени стремится к нулю. Из рис.3 видно также, что с увеличением концентрации лиганда в растворе корреляционные кривые пересекают ось Y вначале вблизи начала координат, затем с увеличением концентрации координата точки пересечения увеличивается и при дальнейшем увеличении концентрации лиганда координата пересечения оси Y начинает уменьшаться. Как и ожидалось, такое поведение точки пересечения оси Y согласуется с кривой на рис.2.

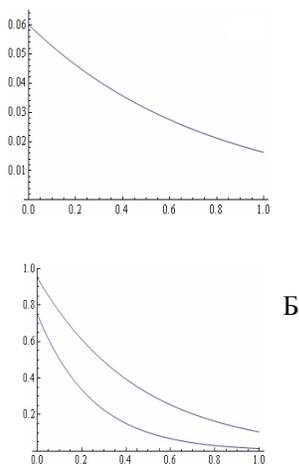


Рис. 3. Зависимость безразмерной стационарной корреляционной функции выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерного времени при различных значениях безразмерной концентрации лигандов в растворе при $n = 2$.

По оси Y отложены $C_I(t) / (N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p)$, по оси X отложены $\tau \cdot k_{-1}$. А. Безразмерная

концентрация $Kc_f = 0.1$. Б. На верхней кривой безразмерная концентрация

$Kc_f = 0.5$, на нижней кривой $Kc_f = 2$.

Представляет интерес зависимость времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе (рис.4).

Из рис.4 видно, что с увеличением безразмерной концентрации безразмерное время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора уменьшается.

Часто экспериментально удобно измерять спектральную плотность. По этой причине приведем графики спектральной плотности выходного сигнала, соответствующие их корреляционным функциям, изображенным на рис.3.

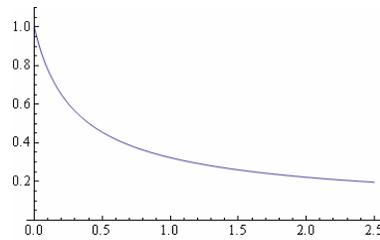


Рис. 4. Зависимость безразмерного времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе при $n = 2$.

По оси Y отложены $\tau \cdot k_{-1}$, по оси X отложены Kc_f .

На рис.5 представлены спектральные плотности выходного сигнала ДНК-биосенсора при различных значениях концентрации лигандов в растворе.

Из рис.5 видно, что с увеличением концентрации лиганда в растворе амплитуда спектральной плотности выходного сигнала вначале растет, а затем при дальнейшем увеличении концентрации лигандов в растворе уменьшается. Такое поведение амплитуды согласуется с кривыми на рис.4. Из рис.5 видно также, что с увеличением концентрации лигандов в растворе частота “завалов” на кривых сдвигается в область больших частот.



Рис. 5. Зависимость спектральной плотности выходного сигнала ДНК-биосенсора от частоты при $n = 2$. По оси Y отложены $S_f(\omega) \cdot k_{-1} / (N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p)$, по оси X

отложены ω / k_{-1} . А. Безразмерная концентрация $Kc_f = 0.1$ Б. На верхней кривой

безразмерная концентрация $Kc_f = 0.5$, на нижней кривой $Kc_f = 2$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян Г.А. Влияние внутреннего шума на выходной сигнала ДНК-биосенсора. МАНЭБ, 2010.
2. Аракелян В.Б., Бабаян С.Ю., Таирян В.И., Аракелян А.В., Парсаданян М.А., Вардеванян Р.О. Кинетика связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами при произвольном связывании. Биофизика, 51, 3, с.370-375, 2006.
3. Ван Кампен Н.Г. Стохастические процессы в физике и химии. М., Высш. шк. 1990.
4. Кубо Р. Статистическая механика. М., 1967.
5. Arakelyan V. B., Babayan Yu. S., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Kinetics of ligand binding to nucleic acids. J. Biomol. Str. Dyn., 23, 4, p.479-484, 2006.
6. Domany E. Analysis of DNA-chip and antigen chip data: studies of cancer, stem cells and autoimmune diseases. Comp. Phys. Commun., 169, p.183-187, 2005.
7. Ihara T., Takata J., Takagi M. Novel method of detecting mismatch on DNA by using photo-induced electron transfer through DNA. Anal. chem. acta, 365, p.49-54, 1998.
8. Mockler T.C., Chan S., Sundaresan A., Chen H., Jacobsen S.E., Ecker J.R. Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. Genomics, 85, p.1-15, 2005.

Поступила 19.07.2010.